

# タンパク質の構造と複合体形成および機能調節に関する研究 (Research of structural adequacy of proteins in functional complex)

橋本 愛美

## 第一章・序

タンパク質は生物の生命活動を支える基本的な物質であり、その構造や機能の解析は、医療や生命工学など、将来にわたり我々の生活に貢献できる体系的な知識・理論の構築に不可欠である。タンパク質の機能はそのタンパク質がとる特有の立体構造に依存していることは広く理解されており、また多くのタンパク質の立体構造が X 線結晶構造解析により決定されてきたため、タンパク質は安定した立体構造を保持することで機能を発揮するというイメージがいまだ根強く残っている。しかし実際にはタンパク質はその構造を動的に変化させることで機能を発揮している。例えばタンパク質の中には単独では構造を保持していないもの(天然変性タンパク質)が相当数あり、このようなタンパク質が生体内で重要な機能を発揮していることは 2000 年代初頭には認識されている。また生体内でタンパク質が他のタンパク質と複合体を形成することは珍しくなく、動的複合体の形成の仕組みやその機能調節の機構の解明が生命活動の理解に必要であることは明白である。私はこのようなタンパク質の動的変化と機能の関係性に興味をもち、複数の材料を用いて検証をおこなった。

## 第二章・Salmonella のべん毛モーターにおけるタンパク質 FliG ドメインII の役割

べん毛タンパク質である FliG は、べん毛モーターが回転する際のトルク発生源として注目されるタンパク質で、固定子として働く MotA と相互作用すると考えられており、分子内に 2 つのドメインを持っている(図 1)。このうちドメイン II の疎水性コアを形成する特定のアミノ酸に変異が入ると、培養温度依存的に回転機能を変化させる超温度感受性変異株(Hyper-TS mutant)が生じる。本研究では、疎水性コアを形成するアミノ酸のうち、4 か所のアミノ酸を他の 19 種のアミノ酸に置換した変異株をそれぞれ作成し、置換したアミノ酸の種類と形質の変化の関連を調べた(図 1(b))。その結果、FliG の疎水性コアの構造維持がトルク発生に重要であることが示された。Hyper-TS mutant では、変異 FliG の疎水性コアの構造が高温の影響で可逆的に変化するため、MotA との分子間相互作用が阻害されるのではないかと予想している。

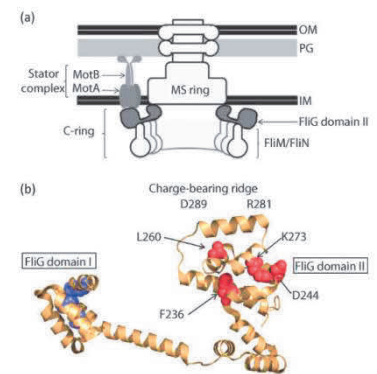


図 1 (a) べん毛モーター模式図。OM: 外膜, PG: ペプチドグリカン層, IM: 内膜  
(b) FliG の分子モデル。T. maritima の FliG (PDB ID: 1LKV) に、Salmonella のアミノ酸番号を記載している。

## 第三章・Salmonella のべん毛フックのもつ柔軟性とテザードセルにおける機能的役割

テザードセルは、スライドガラスにべん毛が固定された状態で回転している菌体のことである。べん毛が回転することを直接的に証明した実験法であり、菌体が剛体であるフック(FlgE が重合したチューブ状の構造体)により持ち上げられた状態で回転していると考えられてきた(図 2(b))。これまで多くの研究でべん毛モーターの機能を定性的・定量的に検証する手段として利用されてきた。しかし、モータータンパク質である FliN に YFP (yellow fluorescent protein) を連結して発現させた Salmonella

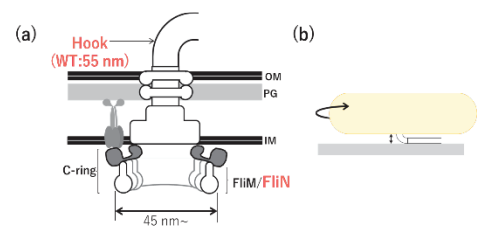


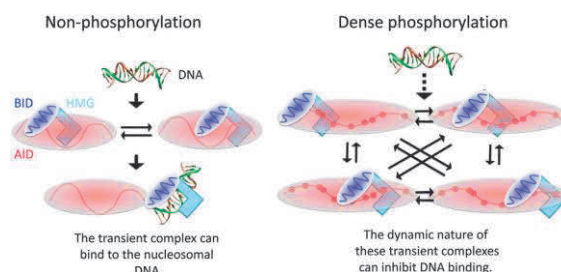
図 2 (a) べん毛モーター模式図。  
(b) テザードセルの模式図。

を使ってテザードセルを作成したところ、回転中心にあるはずの YFP の蛍光が、直径 100 – 200 nm の楕

円を描いて回転していることを発見した。フックの長さが異なる変異株を用いて同様の実験を行ったところ、フックの長さや YFP-FliN の回転半径には相関があり、フックが柔軟に曲がることでモーターが回転していることがわかった。FlgE の重合体であるフック自体が柔軟に曲がるには、タンパク質同士の相互作用の様式もしくは FlgE の構造を複数想定する必要があるが、本研究ではそれを検証するまでには至らなかった。しかし、フックが柔軟であるという新たな知見を示すことはできた。

#### 第四章・天然変性領域に対する複数リン酸化を通じた FACT の動的機能調節

FACT はクロマチンリモデリング因子に分類され、SSRP1 と SPT16 の 2 つのサブユニットで構成されている。SSRP1 にある HMG ボックスを介してヌクレオソームの DNA と静電的に結合するが、この結合は隣接する AID (acidic intrinsically disordered region) がリン酸化を受けることで阻害されることが分かっている。AID が広範囲にリン酸化されることで負電荷領域が増加し、その部分が HMG ボックスと強く相互作用するためと予想されたがその本質的なメカニズムは不明のままであった。そこで本研究では、NMR 解析と AFM による解析により、リン酸化された AID がどのように BID-HMG (basic ID region + HMG) と DNA の相互作用を阻害するのかを調査した。その結果、AID はリン酸化や HMG ボックスとの結合により特定の構造を持つことはないこと、そして、リン酸化は AID 上の BID-HMG 結合部位の増加をもたらし AID と HMG が相互作用する確率を上げている可能性が示された。リン酸化 AID と HMG とが動的複合体を高確率で形成することで、DNA 存在下でも強力な分子内相互作用が維持されると結論付けられた。



#### 結語

本研究では、タンパク質同士で複合体や重合体を形成するタンパク質を採り上げ、構造と機能の関係について検証を行った。その結果、他のタンパク質と協調して機能するタンパク質は、その分子間相互作用が状況に応じて素早く調節され、またこの調節には分子内の動的な相互作用や一時的な構造の変化などが利用されていることを示すことができた。

#### 【参考論文】

- (1) The hydrophobic core of FliG domain II is the stabilizer in the *Salmonella* flagellar motor.  
Manami Hashimoto, Kazuya Momma, Satoshi Inaba, Shogo Nakano, and Shin-Ichi Aizawa., *Microbiology* (2012), 158, 2556–2567
- (2) Functional Roles of the Hook in a Rotating Tethered Cell.  
Manami Hashimoto, Takuji Mashimo, Takanori Hirano, Shigeru Yamaguchi and Shin-Ichi Aizawa., *J. Mol. Biol.* (2008), 375, 367–375
- (3) Phosphorylation-Coupled Intramolecular Dynamics of Unstructured Regions in Chromatin Remodeler FACT  
Manami Hashimoto, Noriyuki Koderu, Yasuo Tsunaka, Masayuki Oda, Mitsuru Tanimoto, Toshio Ando, Kosuke Morikawa, and Shin-ichi Tate., *Biophysical Journal* (2013), 104, 2222–2234

#### 【関連論文】

- (1) Temperature-Hypersensitive Sites of the Flagellar Switch Component FliG in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*.  
Takuji Mashimo, Manami Hashimoto, Shigeru Yamaguchi, Shin-Ichi Aizawa., *J. Bacteriol.* (2007), 189, 5153–5160
- (2) Exchangeability of the flagellin (FliC) and the cap protein (FliD) among different species in flagellar assembly.  
Satoshi Inaba, Manami Hashimoto, Jeevan Jyot, Shin-Ichi Aizawa., *Peptide Science* (2013), 99(1), 63–72
- (3) Ultrasensitive change in nucleosome binding by multiple phosphorylations to the intrinsically disordered region of the histone chaperone FACT.  
Daisuka Aoki, Akinori Awazu, Masashi Fujii, Jun-ichi Uewaki, Manami Hashimoto, Naoya Tochio, Takashi Umehara, Shin-ichi Tate., *J. Mol. Biol.* (2020), 432(16), 4637–4657.