

# 学位論文

## 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)

2023 年

橋本 愛美

## 目次

### 1. 主論文

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

### 2. 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

### 3. 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, and Shin-ichi Tate

J. Mol. Biol. (2020) 432(16), 4637-4657.

# 主論文

## 目次

### 主論文

#### 目次

#### 第 1 章 序

1-1 研究の背景 ..... 3

1-2 研究の目的 ..... 5

#### 第 2 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

2-1 導入 ..... 14

2-2 方法 ..... 20

2-3 結果 ..... 31

2-4 考察 ..... 46

#### 第 3 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

2-1 導入 ..... 55

2-2 方法 ..... 59

2-3 結果 ..... 64

2-4 考察 ..... 79

#### 第 4 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

2-1 導入 ..... 87

2-2 方法 ..... 91

2-3 結果 ..... 96

2-4 考察 ..... 116

#### 第 5 章 結語 ..... 130

#### 謝辞 ..... 132

## 第1章 序

### 1-1 研究の背景

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る。したがって、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。そして、タンパク質のもつ機能は、そのタンパク質が持つ特有の立体構造によって決定するとされてきた。生体内においてタンパク質の立体構造は自発的に、あるいはシャペロンタンパク質などの仲介を経て構築されていくが、完成される立体構造を決定づけているのはそのタンパク質を構成するアミノ酸の配列と翻訳後修飾である。数多くのタンパク質の立体構造が X 線結晶構造解析によって決定されてきた。結晶化が容易なタンパク質は比較的二次構造が多く安定した立体構造を有している。そのため、一般的な書物の中には、いまだにタンパク質の構造に対して、「剛体に近い安定した構造を持つ分子であり、構造がなければ働くことができない」といった古典的なイメージにのみとらわれた解説も多くみられる。

結晶化が難しいタンパク質については、部分構造やアミノ酸配列の保存性を利用したバイオインフォマティクスによる構造予測が適用されるが、タンパク質の立体構造がいくつかの状態間を遷移している場合に、その状態のすべてを観測することは難しい。一方で NMR は結晶化が難しいタンパク質の溶液中の構造を決定することに長けており、温度や塩濃度、リガンドの有無といった外的要因の影響によるタンパク質の動的な変化を観測することも可能である。このように、X 線結晶構造解析のデータと NMR による観測データを組み合わせることで、タンパク質に対する古典的なイメージは徐々に変化してきた。さらに、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:

天然変性領域をもつ分子) 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た。天然変性領域は,真核生物の転写制御に関わるタンパク質中に多く存在し,他の分子と相互作用をすることで構造を持ち機能を発揮するものや,構造を持たないまま機能するものなど,そのはたらき方もさまざまである。このように,タンパク質とは非常に幅広い特徴を持つ分子集団であり,その構造と機能との関係性については興味が尽きることはない。そして,例えば生体内ではたらくタンパク質をターゲットとした病気治療法や医薬品の開発には,タンパク質の構造だけでなく機能発揮時の挙動や機能調節の機構に関する理解が不可欠であることは言うまでもなく,種々のタンパク質に対する正しい理解が速やかになされることが望まれている。

私はこのようなタンパク質の構造と機能の関係性について幅広く理解することを目的に,分子生物学的手法,各種顕微鏡による観察,NMRによるタンパク質の動的変化の観測を行うことにした。安定した立体構造を持つタンパク質,構造を持たない天然変性タンパク質,それらの重合体あるいは他タンパク質との複合体を対象とし,機能と構造の関係性についてそれぞれ検証した。

## 1-2 研究の目的

生体内ではたらくタンパク質の多くは他の分子との複合体を形成しているため、あるタンパク質の機能を理解するためには、単独ではなく他分子と相互作用した際の振舞や、相互作用の様式、その調節機構の解明が必要である。本研究は複数の材料を用いて、タンパク質の構造とその物性を解明し、複合体形成時の挙動やそれにより与えられる機能について理解することを目的としている。

### 1-2-1 *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

*Salmonella* のべん毛は大きく分けて、基部体、フック、フィラメントの部分に分けられ、これらはそれぞれタンパク質が重合することで形作られたものである。基部体はべん毛を回転させるためのモーターとして機能し、基部体で発生したトルクをスクリューとして働くフィラメントに伝える、ユニバーサルジョイントとしての役割を持つ部分がフックである。図 1-1 (a)に示すように、基部体は複数のリングやロッド状のタンパク質重合体により組み立てられ、Cリングと呼ばれるカップ状の部分は3種類のタンパク質 (FliG/FliM/FliN) で構成される。Cリングは、フックやその先につながるべん毛繊維の構築に関わるタンパク質の細胞外への輸送に深く関わっていると同時に、べん毛モーターのトルク発生を担っており、特に FliG 分子内にトルクの発生に直接かかわる部分があるといわれている。

*Salmonella* の FliG は、2つのドメインから構成されている (図 1-1 (b))。N 末端側にあるドメインIIは主にべん毛の構築に関わる部分であり、C 末端側にあるドメインIIIにトルク発生に関わる場所があると考えられている。*Salmonella* の FliG 変異株には、培養温度によって敏感に遊泳能力を変化させる、「Hyper-temperature sensitive mutant (TS mutant)」が複数株存在し、それらはドメインIIが

もつ疎水性コア周辺を構成するアミノ酸に置換が起きていることが分かっている (Mashimo *et al.*, 2007)。本研究では、このアミノ酸の置換による遊泳能力の変化の原因は温度によるタンパク質の構造の変化によるものであると予想し、Hyper-TS mutant が生じた F236 , D244 , K273 のアミノ酸を、その他 19 種類のアミノ酸に置換した FliG 変異株を作成して、アミノ酸の種類と温度変化がドメインIIの疎水コアの立体構造の安定性に与える影響と、べん毛モーターの機能変化との関係性を調べた。その結果から、FliG におけるべん毛モーターのトルク発生機構について考察する。(第2章および参考論文②)



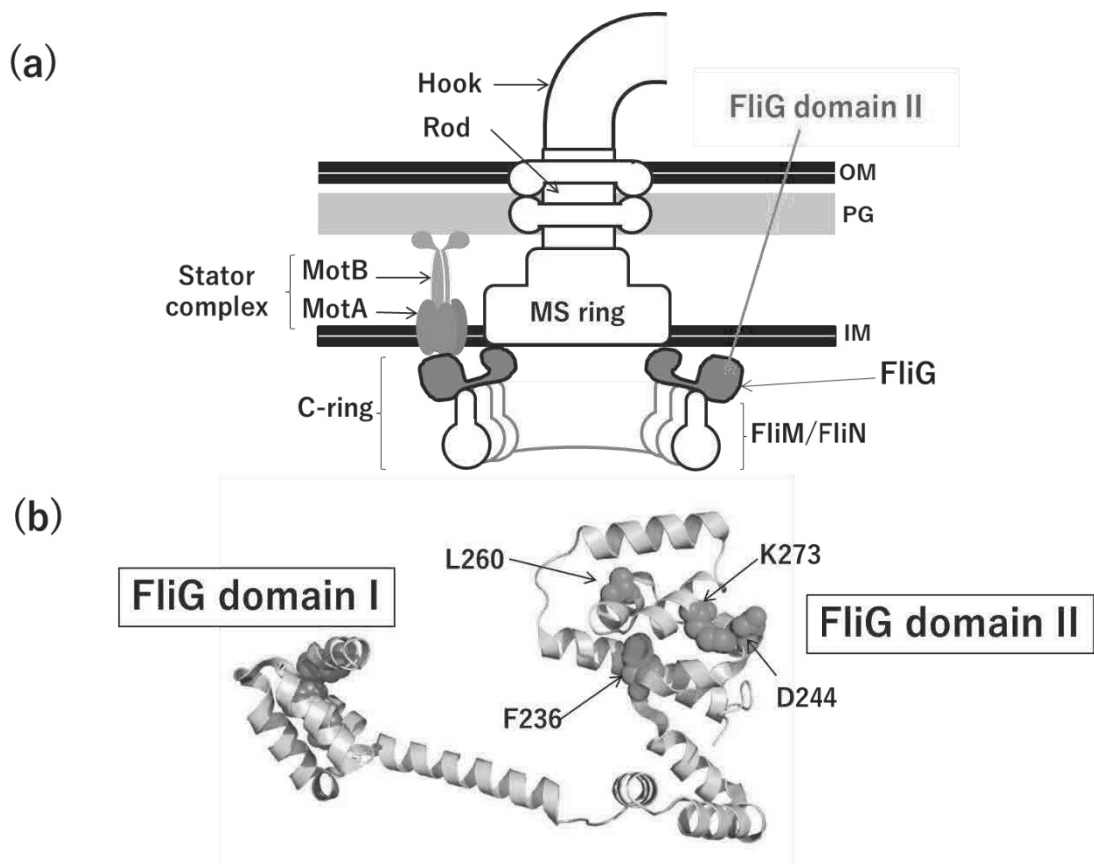


図 1-1 *Salmonella* のべん毛モーターの模式図 (a)と FliG のタンパク質モデル (b)

(a) C リングは FliG/FliM/FliN がリング状に重合した構造体で、モーターの回転子である。MotA/MotB 複合体が固定子になる。

OM ; outer membrane, PG ; peptidoglycan, IM ; inner membrane

(b) *Ter motoga maritima* の FliG の構造 (PDB ID: 1LKV) に *Salmonella* のアミノ酸番号を記載している。F236, D244, K273 は Hyper-TS mutation site である。

## 1-2-2 *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

細菌のべん毛モーターのトルク発生の仕組みは、べん毛モーターが発見されて数十年の間、多くの研究成果が掲げられてきたにもかかわらず、その詳細についてははっきりとした結論が出ていない。

細菌のべん毛が回転運動をしていることは、テザードセル（べん毛を抗べん毛抗体などでガラス表面に固定された細菌）を観察することで、1970年代には示されていた。また、クライオ電子顕微鏡による詳細な観察から、べん毛を回転させるモーターが、図 1-1 (a) のように複数の部品が美しく組みあがった構造体であることが示され、さらにべん毛やモーターの構造に異常のある変異体や、見た目には異常はないが運動能を失った変異体などの解析により、べん毛モーターを構成するタンパク質は約 30 種類あることがわかった。現在では、モーターを構成する各部品の遺伝子まですべて同定されている。

X線構造解析により、それらタンパク質の立体構造が部分的に決定されると、顕微鏡下で観察されるべん毛の挙動と合わせて、回転トルクの発生機構についての議論は活発化した。しかしべん毛モーター自体が非常に小さいこと、べん毛モーターおよびべん毛自体を構成するタンパク質に自己集合性があり、単体の結晶化が非常に困難であるなどの原因により、トルク発生機構はこれまでの間接的な証拠を組み合わせて推論していくことしかできていない現状がある。

本研究では、べん毛モーターのトルク発生の機構を分子レベルで解明するために、Cリングを構成するタンパク質のうち FlhN に蛍光タンパク質である YFP を連結させたキメラタンパク質を発現する形質転換株を *Salmonella* で作成し、蛍光顕微鏡下でテザードセルの挙動を詳細に観察した。その過程で、テザードセル法は、べん毛モーターとべん毛を連結する部品であるフックの想定外の柔軟

性により、回転トルクの観察・計測において、定量的な結果を得ることには利用できないのではないかという疑問が生じた。これは、それまでフックおよびその構成タンパク質 (FlgE) を剛体とみなし (図 1-2), テザードセルを回転トルクの定量的な測定に利用してきた過去の実験の結果・考察に対して見直しを行う必要性を示唆した。

フックタンパク質 (FlgE) の重合体であるフックのもつ柔軟性について、顕微鏡観察の結果を詳細に分析することで新たな知見を提示する。(第 3 章および参考論文③)

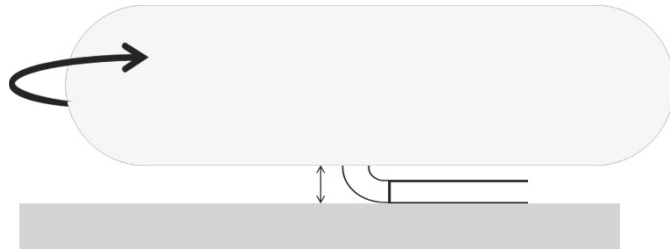


図 1-2 一般的なテザードセルの模式図

テザードセルは、一本のべん毛をガラス表面にたいして抗べん毛抗体で固定した状態で回転する細胞のことである。べん毛モーターからつながる硬いフックによって菌体はガラス表面 (抗べん毛抗体) から一定の高さの位置に持ち上げられ、べん毛モーターを中心に自由に回転していると認識されていた。

### 1-2-3 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

タンパク質の内部にある天然変性領域 (Intrinsically Disordered Region : IDR) の存在は、例えば基本転写因子や調節タンパク質においてしばしば確認されている。またこれまでの研究で、IDR は遺伝子発現の調節過程に深くかかわっていることが示されており、その機能にはリン酸化のような翻訳後修飾が関係していることも分かっている (Vuzman *et al.*, 2012; Fuxreiter, 2004; Iakoucheva *et al.*, 2004)。

Structure-Specific Recognition Protein 1 (SSRP1) および Suppressor of Ty 16 (SPT16) がヘテロダイマーを形成したクロマチンリモデリング因子 (facilitates chromatin transcription : FACT) は、転写の際にクロマチンを変形させる働きを持つタンパク質複合体である。同研究室の以前の研究により、*Drosophila* の FACT (dFACT) にある IDR のうち、AID (acidic ID) 領域へのリン酸化が FACT とヌクレオソームとの結合能を調節することが示されている。高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) と NMR を用いた研究により、dFACT が、SSRP1 上にある HMG (high-mobility-group ドメイン) とその周辺の BID (basic ID) 領域を介してヌクレオソームの DNA と結合すること、BID に隣接する AID が BID や HMG と分子内相互作用すること、そしてこの分子内相互作用が AID を広範囲にリン酸化することで強くなることが分かっている (Miyagi *et al.*, 2008; Tsunaka *et al.*, 2009)。分子内相互作用が強くなることにより、HMG および BID の DNA への結合は阻害され、その結果 FACT のヌクレオソームとの結合が阻害される。このように、AID のリン酸化が FACT の機能調節に需要であることは示されていたが、分子レベルでの阻害機構については不透明なままであった。

そこで本研究では NMR を用いて、AID 断片と HMG あるいは BID を含む HMG (SB-HMG) の相互作用について詳細に分析した。また、AID をリン酸化し

た場合の結果と比較することで, AID がどのように HMG と DNA の結合を阻害するのか, そのメカニズムを提示する。(第 4 章および参考論文④)

## 参考文献

Fuxreiter, M. (2012). Fuzziness: linking regulation to protein dynamics. *Mol. Biosyst.*, 8, 168–177.

Iakoucheva, L.M., Radivojac, P., Dunker, A.K. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.*, 32, 1037–1049.

Mashimo, T., Hashimoto, M., Yamaguchi, S. and Aizawa, S.-I. (2007). Temperature-hypersensitive sites of the flagellar switch component FliG in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 189, 5153-5160.

Vuzman, D., Levy, Y. (2012). Intrinsically disordered regions as affinity tuners in protein-DNA interactions. *Mol. Biosyst.*, 8, 47–57.

## 第2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

### 2-1 導入

バクテリアのべん毛は、細胞膜上にあるべん毛モーターで発生したトルクにより旋回する (Aizawa, 2009; Macnab, 1996)。トルク発生のエネルギー源はプロトン駆動力であり、発生源は固定子としてはたらく MotA と MotB (MotAB) と、回転子としてはたらく C リングとの相互作用部位であるといわれている。C リングは、FliG, FliM, FliN の 3 種類のタンパク質で構成されるカップ状の構造体で、べん毛が構築される際に必要なタンパク質を細胞外に分泌するための役割も担っている。べん毛モーターの回転に異常のある変異株の解析により、3つのタンパク質すべてがトルクの発生に関わっていることが示された (Irikura *et al.*, 1993; Socket *et al.*, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1986a,b)。しかし、いくつかの証拠により、FliG が FliM, FliN よりもトルクの発生により直接的に関わっていることが示され、FliG と MotA にある荷電残基が相互作用することで、トルクが発生していると一般的には理解されるようになった (Lloyd *et al.*, 1996, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1986a,b)。しかしながら、この考え方は過去の研究結果から推測される仕組みや仮定をもとに作られたものであり、直接的な証拠が少なくきわめて不明瞭であるため、その詳細な仕組みはいまだ検討すべきテーマになっている。

FliG は 4 つの部分に分けることができる。MS リングと結合する N 末端、中心付近にあるドメイン I, C 末端側にあるドメイン II, そして 2 つのドメインをつなぐ  $\alpha$ -helical linker である (Lee *et al.*, 2010)。いくつかの先行研究 (Fukuoka *et al.*, 2004; Yakushi *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2002, 2003) において、FliG のどの部分がトルク発生に関わっているかを調べるために、自然発生した Mot<sup>-</sup> mutant (モーターの回転が停止した変異株)と、任意のアミノ酸をトリプトファンに置換



した変異株を分析した結果から、ドメインIIの荷電残基が並んだ charge-bearing ridge と MotA の荷電残基の間の静電気力がトルクを発生させると提案された (図 2-1 (a))。しかし一方で、この提案の不備を指摘する例証もある。例えば、上記のような仕組みでトルクが発生するのならば、FliG の charge-bearing ridge が電荷を失えば、モーターも回転は停止するはずである。しかし実際には、荷電残基をすべて無電荷のアミノ酸に置換したとしても、回転を完全に停止させることはできなかった。また、自然発生した Mot<sup>-</sup> mutant の変異箇所を解析しても、charge-bearing ridge にある荷電残基 (K264, R281, D288, D289, R297) に変異がみられたものはなかった。そして、真下ら (県立広島大学) の研究により、FliG のドメインIIへの変異によってモーターの回転が停止したと考えられていた Mot<sup>-</sup> mutant をより注意深く観察したところ、そのうちのいくつかは、適切な温度で培養することで遊泳することが分かった (Mashimo *et al.*, 2007)。このような形質を示すアミノ酸変異箇所は charge-bearing ridge の領域外にあり、トルク発生に関わる部分が charge-bearing ridge 以外にも存在することを示している。このような研究結果は、FliG によるトルクの発生の説明が現在提案されているモデルでは不十分であることを表している。そこで本研究では、トルクの発生の詳細な機構を提案することを目指し、FliG の温度感受性変異株 (TS mutant) の挙動とアミノ酸の変異箇所、変異したアミノ酸の種類との関係性を調べることにした。

FliG のドメインIIは、charge-bearing ridge に加え、内部に疎水性コアを持つ。*Salmonella* の TS mutant のうち、疎水性コアを形成するアミノ酸が置換した変異株である F236V, D244Y, K273E は、特に温度変化に敏感に感応する Hyper-TS mutant である (図 2-1 (b))。通常の TS mutant は、培養温度 20°C で構築したべん毛は常に正常に回転し機能するが、許容温度を超える環境下で培養した場合、べん毛は構築されるがモーターの回転は停止し遊泳しない。一方 Hyper-TS mutant

は、培養温度 20°Cで構築したべん毛であっても、周囲の温度が上昇し許容範囲を超えれば減速することなく突然停止する。そして、温度を 20°Cに戻せば再びモーターは回転し、菌体は遊泳を始める (図 2-3)。この特徴から Hyper-TS mutant では、変異により FliG が温度変化に対して敏感に構造を変化させ、その結果 FliG 上にあるはずのトルク発生に関わる部分と固定子である MotA との相互作用がうまくいかなくなるのではないかと推測された。そして、Hyper-TS mutant においては、FliG の疎水性コアがモーターの回転を停止させるためのクラッチのような役割をしているのではないかと予測した。過去に、*Bacillus subtilis* においてはクラッチの存在が示されているが、*Salmonella* でそれが示された例はない (Blair *et al.*, 2008)。

本研究では FliG のドメインIIの役割について考察するために、*Salmonella* の FliG の 4 か所のアミノ酸 (F236, D244, K273, L260 (negative control)) をその他 19 種類のアミノ酸に置換した変異株を作成し、それぞれの変異株の温度感受性について詳細に分析した。

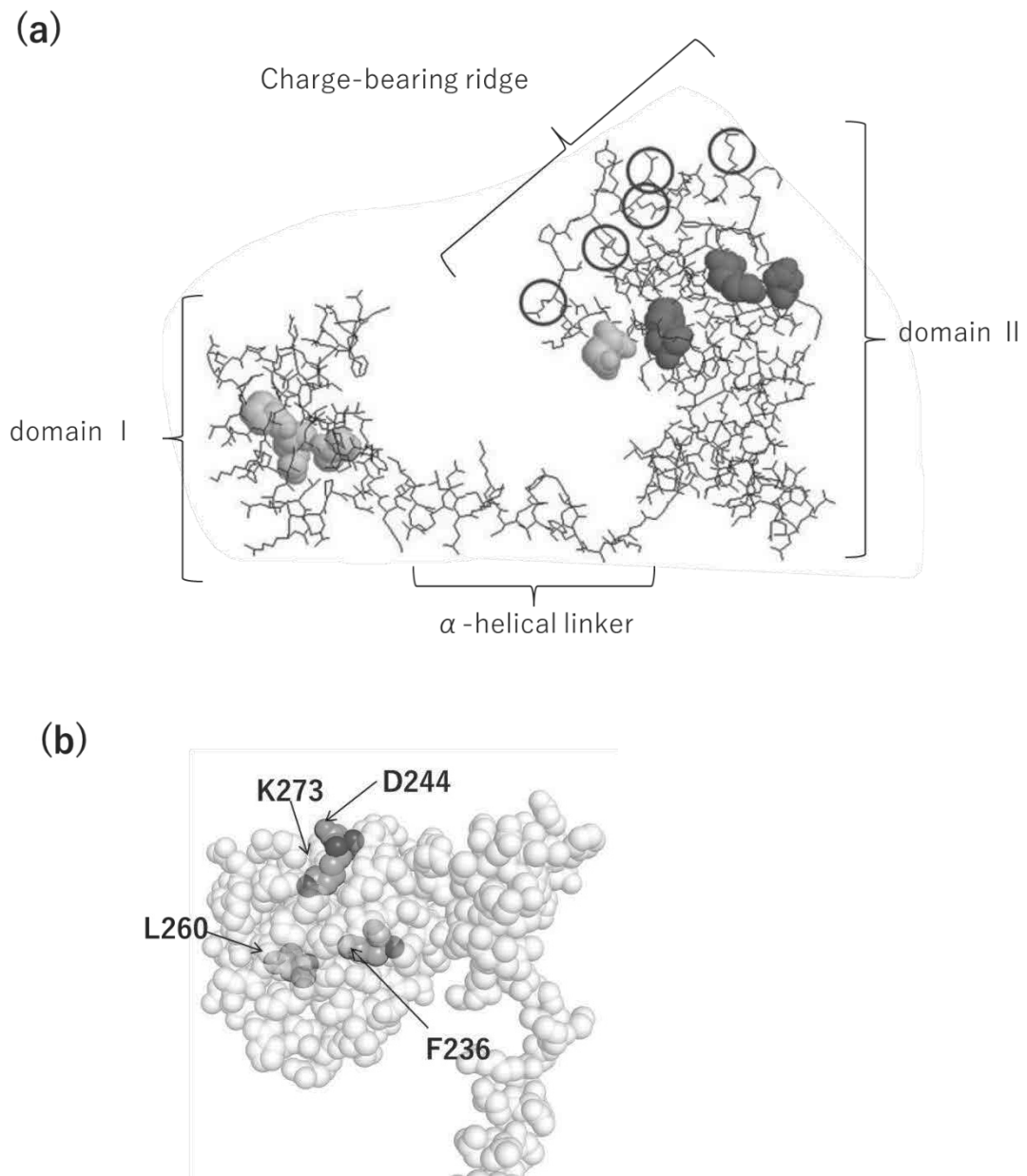


図 2-1 FliG 模式図

(a) Molecular wireframe model による FliG 図 (Mashimo *et al.*, 2007)。Circle; MotA と相互作用すると報告されたアミノ酸残基, Black ball; Hyper-TS site, Gray; TS-site

(b) Space-filling model により FliG ドメインII図。F236, D244, K273 は Hyper-TS site であり, L260 はネガティブコントロールとして利用したアミノ酸である。

1 MSNLSGTDKS VILLMTIGED RAAEVFKHLS TREVQALSTA MANVRQISNK  
51 QLTDVLSEFE QEAEQFAALN INANEYLRVS LVKALGEERA SSLEDILET  
101 RDTTSGIETL NFMEPQSAAD LIRDEHPQII ATILVHLKRS QAADILALFD  
151 ERLRHDVMLR IATFGGVQPA ALAELTEVLN GLLDGQNLKR SKMGGVRTAA  
201 EIINLMKTOQ EEAVITAVRE FDGELAOKII DEMFLFENLV DVDDRSIQRL  
251 LOEVDSESL IALKGAEPP L REKFLRNMSQ RAADILRDDL ANRGPVRLSQ  
301 VENEQKAILL IVRRLAETGE MVIKSGEDTY V

図 2-2 *S. typhimurium* FliG (WT) のアミノ酸配列

下線部は、本研究でドメインIIとして発現させた領域を示す。カラーでラベルしたアミノ酸は、遺伝子操作により置換したアミノ酸の位置を示す。

赤 ; F236, 緑 ; D244, 黄色 ; L260, 青 ; K273

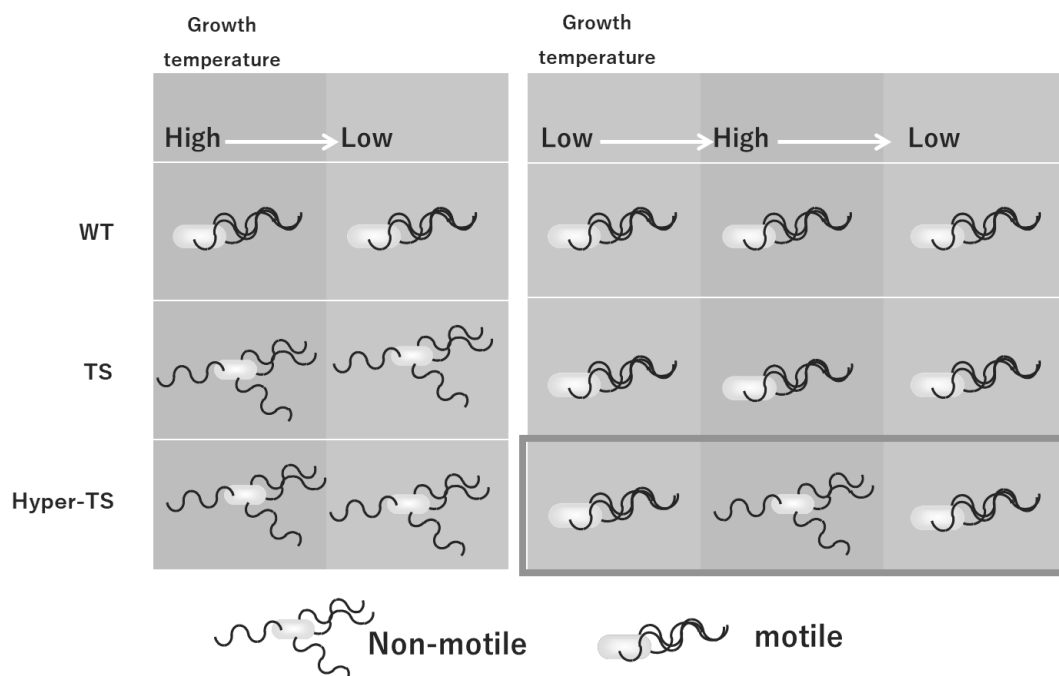


図 2-3 TS mutant および Hyper-TS mutant の温度依存的な遊泳の変化

オレンジは 30°C 以上，青は 20°C より低い温度条件を表している。WT は培養温度に関係なく遊泳能力を有する。TS mutant のべん毛モーターは，構築された時の培養温度によって回転できるかどうかが決まる。Hyper-TS mutant のべん毛モーターは，低温培養条件下で構築した場合であっても，高温条件に移せば停止し，さらに低温条件下に戻せば再度回転を始める。

## 2-2 方法

### (1) 菌株および生育条件

実験に用いた菌株、プライマー、プラスミドは、表 2-1 および表 2-2 にまとめた。ただし膨大な数になるため、F236x シリーズを作成したときに使用したもののみを記載する。Luria-Bertani (LB) 液体培地 (1% ペプトン, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) にそれぞれの菌株を植菌し、OD<sub>600</sub> が 1.0 になるまで培養したものを実験に用いた。

### (2) 変異株の作成

*Salmonella typhimurium* の DNA 上にある *fliG* に任意の変異を入れるために、λ-Red recombinant system を利用した (Datsenko and Wanner, 2000)。λ-Red plasmid である pKD46 を *S. typhimurium* SJW1103 に導入し、アンピシリン (100 μg/mL) を含む LB 寒天培地で選抜した。pKD46 は、TH4702 (ユタ大学 Kelly T. Hughes 教授より提供) が保持していたプラスミドを精製し使用した。pKD46 は温度感受性レプリコンを持ち、培養温度が 40°C 以上で場合複製が起こらないという特徴があるため、pKD46 を SJW1103 に導入した後は、培養温度を 30°C に設定した。この菌株を MH00 とする。

*S. typhimurium* LT2 由来の形質転換株である TH6701 (LT2Δ*araBAD925::tetRA*, ユタ大学 Kelly T. Hughes 教授より提供) の DNA を鋳型に、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetRA*) を PCR 法により増幅して、電気泳動法により分離した。PCR には酵素として KOD FX (TOYOBO) を使い、*tetRA* 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) で精製した。このとき、プライマーとして用いた *fliG*tetF および *fliG*tetR の 5'にはそれぞれ *fliG* の上流にある *fliF* の配列、*fliG* の下流にある *fliH* の配列を付加しており、これにより増幅された DNA 断片の構造は図 2-4 のよう

になる。この断片をMH00で作ったコンピテントセル (アンピシリン 100 µg/mL, アラビノース 0.2%を含む LB 培地で培養したもの) と合わせ, エレクトロポレーション法により遺伝子導入した。テトラサイクリン 15 µg/mL を含む LB 寒天培地に塗布し, 30°Cで選抜し, コロニー (*ΔfliG::tetRA*)を得た。

SJW1103 の DNA を鋳型として, 変異型 *fliG* の DNA 断片を作成した。例として, 19 種の F236x の作成法について示す。プライマーとして Fp (iG)と F236x-F, および Rp (iG) と F236x-R を使用して PCR を行い, 電気泳動後, それぞれの DNA 断片を精製した。その後, 両断片を物質量が大体同じくらいになるように混ぜ, それをプライマー兼鋳型としてオーバーラップ PCR を行った (図 2-5, Williams *et al.*,1996)。PCR 後の反応液を電気泳動し, 適切なサイズの DNA 断片をゲルから抽出し, 変異型 *fliG* を含む DNA 断片として精製した。

*S. typhimurium ΔfliG::tetRA* をアンピシリン 100 µg/mL, アラビノース 0.2%を含む LB 培地で培養してコンピテントセルを作成した。精製した変異型 *fliG* を加え, エレクトロポレーション法により遺伝子導入した。テトラサイクリン感受性培地に塗布し, 42°Cで培養した (表 2-3, Bochner *et al.*, 1980; Maloy and Nunn, 1981)。これにより, テトラサイクリン耐性遺伝子が変異型 *fliG* に置き換わり, pKD46 が複製されず抜け落ちた菌株のコロニーが得られた。コロニーを形成する菌株の *fliG* の塩基配列を調べ, 目的の変異が入っていることを確認した。

なお, D244x, K273x および L260x については, 変異箇所を変えるために使用したプライマーが異なる点を除いては, 同じ方法で作成を行った。

表 2-1 本研究で用いた菌株とプラスミド

Strains or plasmid	Genotype	Source or referece
<b>Strains derived from <i>S.typhimurium</i> SJW1103</b>		
SJW1103	Wild type	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1984
SJW1776	F236S	Mashimo <i>et al.</i> , 2007
SJW1774	F234V	Mashimo <i>et al.</i> , 2007
SJW2829	F236C	Mashimo <i>et al.</i> , 2007
MH00	SJW1103/pKD46	
MH1	F236L	This study
MH2	F236A	This study
MH3	F236D	This study
MH4	F236G	This study
MH5	F236T	This study
MH6	F236K	This study
<b>Strains derived from <i>S.typhimurium</i> LT2</b>		
TH4702	LT2/pKD46	Bonifield and Hughes, 2003
MH7	F236I	This study
MH9	F236Y	This study
MH10	F236N	This study
MH11	F236R	This study
MH12	F236M	This study
MH13	F236P	This study
MH14	F236E	This study



MH15	F236Q	This study
MH16	F236W	This study
MH32	F236H	This study
<b>Expression Plasmids</b>		
pKD46	$\lambda$ -Red recombinase expression plasmid	Socketk <i>et al.</i> , 1992, Datsenko <i>et al.</i> , 2000
piGdm2	FliG domainII (193-331)	This study
piGdm2_Y244D	Y244D FliG domainII	This study

表 2-2 本研究で用いたプライマー

F236x 作成時に使用したものを記載する。*Salmonella* の WT と異なる配列の部分は太字で表す。

Primer	Sequence (5' → 3')	備考
iGd2-F	atcgc <u>at</u> atgggtggcgtaagaac	下線部は NdeI 認識サイト
iGd2-R	atcggg <u>at</u> ccttagacataggtatc	下線部は BamHI 認識サイト
fliGtetF	gctggtcattcgccagtggatgagtaacgatca tgagta <u>attaagaccactttcacatt</u>	<i>fliF-tetRA</i> オレンジは Fp (iG) と相同な配列
fliGtetR	ccagactgcccacggcaattcattagacatagg tatcctc <u>taagcacttgctcctg</u>	<i>fliH-tetRA</i> 緑は Rp (iG) と相同な配列
Fp (iG)	gctggtcattcgccagtggat	
Rp (iG)	ccagactgcccacggcaattc	
F236L-F	gatgttctctg <u>ttg</u> aaaaatctggtggatg	
F236L-R	catccaccagattttc <u>ca</u> acaggaacatc	
F236A-F	gatgttctctg <u>g</u> ccgaaaaatctggtggatg	
F236A-R	catccaccagattttc <u>g</u> ccaggaacatc	
F236D-F	gatgttctctg <u>g</u> atgaaaaatctggtggatg	
F236D-R	catccaccagattttc <u>at</u> ccaggaacatc	
F236G-F	gatgttctctg <u>g</u> gtgaaaaatctggtggatg	
F236G-R	catccaccagattttc <u>acc</u> aggaacatc	
F236T-F	gatgttctctg <u>acc</u> gaaaaatctggtggatg	
F236T-R	catccaccagattttc <u>g</u> gtcaggaacatc	
F236K-F	gatgttctctg <u>aa</u> gaaaaatctggtggatg	

F236K-R	catccaccagatttt <b>cttc</b> caggaacatc
F236I-F	gatgttct <b>gatt</b> gaaaatctggtggatg
F236I-R	catccaccagatttt <b>caatc</b> caggaacatc
F236Y-F	gatgttct <b>gat</b> gaaaatctggtggatg
F236Y-R	catccaccagatttt <b>catac</b> caggaacatc
F236N-F	gatgttct <b>gaat</b> gaaaatctggtggatg
F236N-R	catccaccagatttt <b>cattc</b> caggaacatc
F236R-F	gatgttct <b>cgag</b> aaaatctggtggatg
F236R-R	catccaccagatttt <b>ctcgc</b> caggaacatc
F236M-F	gatgttct <b>gatg</b> aaaatctggtggatg
F236M-R	catccaccagatttt <b>ccatc</b> caggaacatc
F236P-F	gatgttct <b>ccgg</b> aaaatctggtggatg
F236P-R	catccaccagatttt <b>ccggc</b> caggaacatc
F236E-F	gatgttct <b>ggaag</b> aaaatctggtggatg
F236E-R	catccaccagatttt <b>cttc</b> caggaacatc
F236Q-F	gatgttct <b>cgagg</b> aaaatctggtggatg
F236Q-R	catccaccagatttt <b>ctcgc</b> caggaacatc
F236W-F	gatgttct <b>gtggg</b> aaaatctggtggatg
F236W-R	catccaccagatttt <b>cccac</b> caggaacatc
F236H-F	gatgttct <b>cacg</b> aaaatctggtggat
F236H-R	atccaccagatttt <b>gtgc</b> caggaacatc

表 2-3 テトラサイクリン感受性培地の組成 (1L 当たりの必要量)

Agar	15 g
Tryptone	5 g
Yeast Extract	5 g
Chlortetracycline hydrochloride (12.5 mg/mL stock solution*)	4 mL
NaCl	10 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10 g
Fusaric acid (2 mg/mL stock solution)	6 mL
ZnCl <sub>2</sub> (20 mM stock solution, pH5.5)	5mL

\* 4°Cで遮光して保存する

(Maloy and Nunn, 1981)

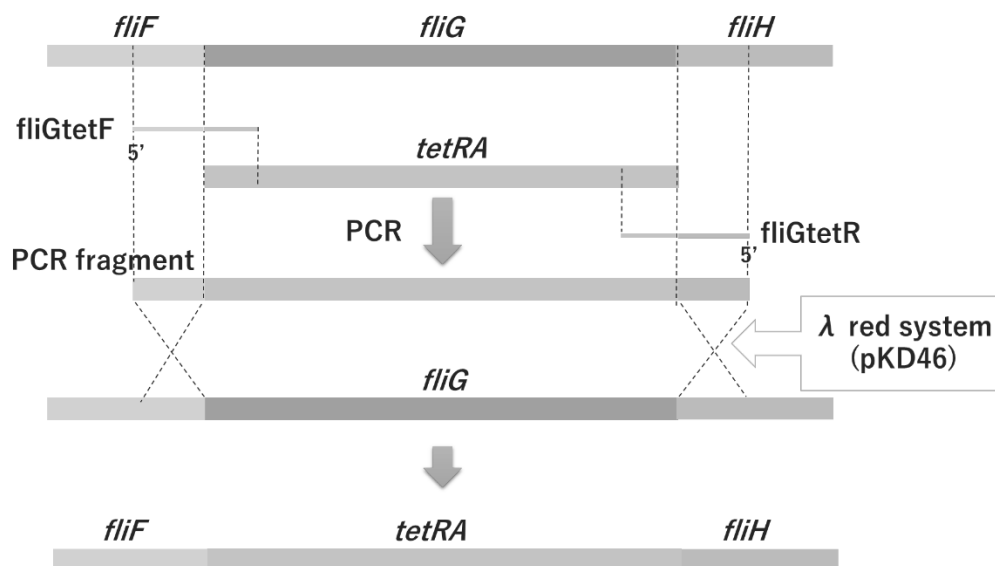


図 2-4 PCR 法による *tetRA* を含む DNA 断片の作成と  $\lambda$ -red recombination システムによる遺伝子の相同組み換え

*Salmonella* のゲノム情報をもとに、プライマー *fliGtetF* と *fliGtetR* を作成した。それぞれ図に示すように *fliF* と *fliH* と相同塩基配列に *tetRA* の配列を連結したものである。*tetRA* を遺伝子導入された TH6701 のゲノムを鋳型に PCR を行い、*fliF-tetRA-fliH* を含む DNA 断片を得た。pKD46 のもつ  $\lambda$ -red recombination システムを利用して、*fliF-tetRA-fliH* 断片と *Salmonella* のゲノムにある *fliF-fliG-fliH* の相同組み換えにより、*fliG* と *tetRA* を置換した ( $\Delta$ *fliG::tetRA*)。

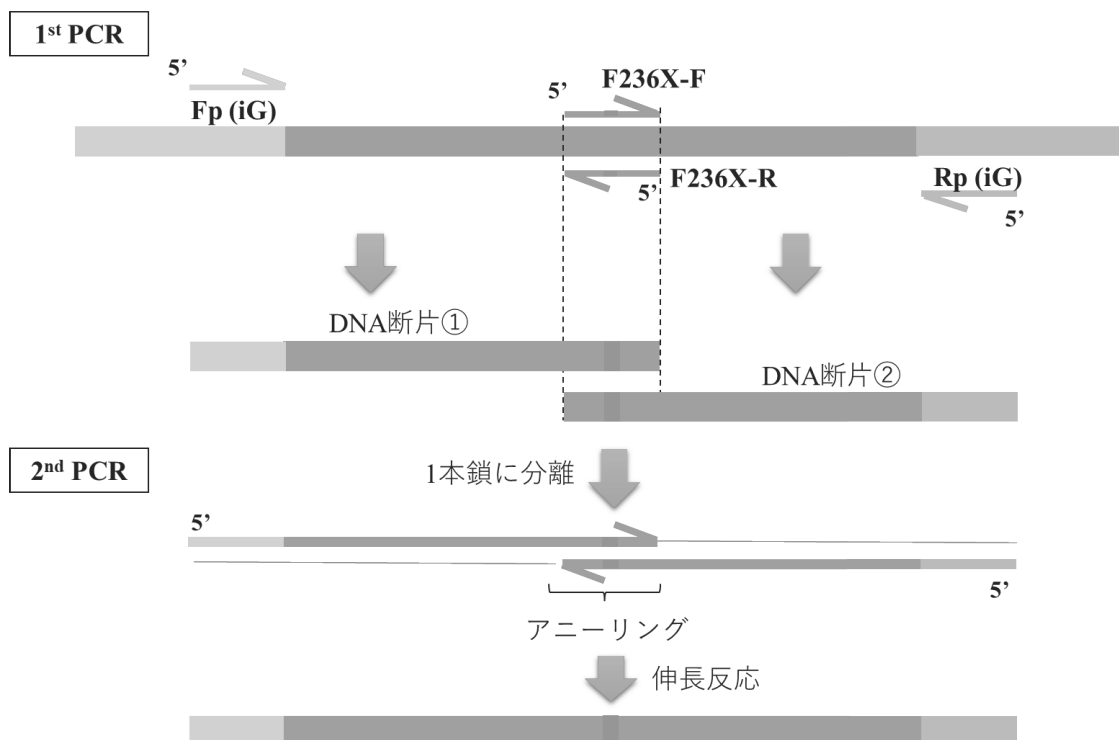


図 2-5 オーバーラップ PCR による変異 *fliG* 断片の作成

赤でマークした位置 (F236 の塩基配列) に変異を入れる場合、1 回目の PCR は、*S. typhimurium* SJW1103 のゲノムを鋳型にして、2 パターンのプライマーの組み合わせで反応を行った。増幅された断片をそれぞれ①・②とする。

① ; Fp (iG) と F236X-R で増幅した断片、② ; Rp (iG) と F236X-F で増幅した断片

①・②を、物質量がおよそ 1:1 になるように混ぜ合わせ、プライマーを加えずに 2 回目の PCR を行くと、①と②にある相同配列がアニーリングして連結される。

### (3) 変異株の温度感受性実験

変異株の遊泳能については、真下らによる報告に従って実験を行った (Mashimo *et al.*, 2007)。温度依存的に変化する様子を位相差顕微鏡 (Olympus CH-2) で観察し、CCD カメラ (Panasonic BL200) で撮影した。その際、ステージには温度調節可能なプレートを設置し、ホールスライドガラスは事前に適切な温度に温めたものを使用した。

それぞれの変異株を、20°Cの LB 液体培地で1晩振とう培養した。これに、遊泳能を観察する直前にクロラムフェニコールを 25 µg/mL になるように添加することで、観察中に新たにタンパク質が合成されることを阻害した。5 分間 20°C で保温した後、保温したホールスライドガラスに培養液 80 µL を入れた。ステージの温度は、20°C→30°C→20°C, 20°C→37°C→20°C, 20°C→42°C→20°Cに変化させ、温度変化が遊泳能に与える影響を録画し観察した。映像から、1回の温度変化実験につき 300 個体を選び、そのうち何個体が遊泳しているかを数えた。これを 3 回繰り返す、平均値を求めた。

次に、同様に 20°Cで培養し準備した培養液を、0.3% Agar を含む LB 寒天培地に 2 µL のせ、20~37°Cで培養し、swarm ring の大きさで半固形培地上での遊泳能を評価した (swarm assay)。

### (4) FliG の精製

*S. typhimurium* の SJW1103 と変異株 D244Y の *fliG* のうち、ドメインIIを含む M193 から V331 までの塩基配列をそれぞれ PCR 法 (forward primer : iGd2-F, reverse primer : iGd2-R)によって増幅し、NdeIおよび BamHIで切断した。pET28a (Novagen) も同様に NdeIおよび BamHIで切断し、先述の DNA 断片と合わせて T4DNA リガーゼにより連結した。これを *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) に導

入した。LB 液体培地で大量培養し、 $OD_{600}=0.6$  になった段階で IPTG を 50 mM になるように添加した。 $OD_{600}=1.0$  になった時点で集菌し、Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH 8.0) で再懸濁した後に、超音波処理により菌体を破壊した。遠心分離後に上澄みのみを回収し、HisTrap FF column (GE Healthcare)を用いて、His-tag が付加された FliG ドメインIIを分離・精製した。これに thrombin を添加して 4°C で 16 時間反応させることで His-tag を切断し、HPLC (Biologic DUOFLOW, Bio-Rad) を用いて Hi Trap Q HP (GE Healthcare) に吸着させた。Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH 8.0) 内の NaCl 濃度を 0 から 1 M に連続的に変化させ、目的とするタンパク質断片を溶出した。50 mM NaCl を含むリン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH 7.0) を外液にして透析し、Amicon Ultra 3K centrifuge filter unit (Millipore) を使ってタンパク質を濃縮した。

SJW1103 は 37°C で培養し、変異株 D244Y は 16°C で培養をした。これは、変異株 D244Y では、大量培養の際の温度が 37°C であった場合、精製中に変異型 FliG が凝集するが、16°C の場合にはそれがみられなかったためである。また、D244Y が Hyper-TS mutant であり、37°C で培養した場合にモーターの回転が止まるため、モーターとしての機能を維持したタンパク質を精製するためには 20°C 以下での培養が好ましいと思われるからである。タンパク質濃度は 20  $\mu$ M 程度になるように調整した。

精製したタンパク質の円二色性スペクトルを測定し (Jasco J-720W spectropolarimeter), 温度依存的なタンパク質の構造変化があるかどうかを調べた。



## 2-3 結果

### 2-3-1 FliG 変異株の温度感受性について

本研究で作成・使用した FliG 変異株は、電子顕微鏡での観察により、培養温度に関わらずべん毛が正常に形成されていた。

#### (1) F236x

Swarm assay の結果、培養温度が 20°C の場合は F236L/M/Y/W は野生型 (WT) ほぼ同じ大きさの swarm ring が形成され、F236I/V はそれよりもやや ring の広がりが劣る結果となった (図 2-5 (a))。37°C で培養した場合には、WT と F236W 以外のすべての変異株で swarm ring の形成が阻害された(図 2-5 (a))。また、20°C で swarm ring の形成がみられた 6 つの変異株については、25°C と 30°C の条件で実験を行った結果、F236V は 25°C、F236I/L は 30°C でも swarm ring が形成されないことが分かった(図 2-5 (b))。以上の結果から、F236I/V/L/M/Y の 5 つの変異株は TS-mutant であることが確認された。一方で、F236W には温度変化の影響は見られず、実験を繰り返す中で、WT よりも swarm ring が大きく広がる場合もあり、TS mutant ではないことが分かった。WT と F236I/V/L/M/Y/W 以外の変異株は、どの温度でも swarm ring が確認されなかったことから、Mot<sup>-</sup> mutant であることも分かった。これら Mot<sup>-</sup> mutant については、べん毛の形成が正常に行われていることを確認している。WT を含め、20°C で遊泳能が確認された変異株のもつ 236 番目のアミノ酸はすべて疎水性残基であり、温度変化に対する遊泳能の安定性は F=W>Y>M>I=L>V の順になっていた(表 2-4)。これは、各アミノ酸の側鎖の分子サイズとほぼ一致している (図 2-7)。また、側鎖にベンゼン環を持つアミノ酸への置換による変異株は、比較的 WT に近い形質を保持することが

分かった。

次に、温度変化に対してどれくらい敏感に遊泳能が変化するかを評価するために、液体培地中で遊泳する個体について、温度変化と遊泳する個体数との関係を調べた。F236I/V/L/M/Y は、20°Cで培養した場合はほとんどの個体が遊泳したが、37°Cで培養した場合には Mot<sup>-</sup>の形質を示した (図 2-6)。そして表 2-5 にあるように、20°Cで培養しべん毛を構築 (FliG を合成後 C リングを形成) した個体では、温度上昇に伴って Mot<sup>-</sup>の形質を示すものも見られたが、それらを 20°C の環境下に戻せば、再び遊泳を始めたことから、これら 5 つの変異株はすべて Hyper-TS mutant であることが分かった。20°Cの液体培地で 1 晩振とう培養した培養液には、一連の温度変化実験を行う前にクロラムフェニコールを添加しており、観察中に新たに FliG が合成されることはない。つまり、20°Cの温度条件下で構築された C リングに組み込まれた変異型 FliG が、温度変化に敏感に反応し、何らかの変化を伴ってべん毛モーターの回転を阻害したと考えることができる。また swarm assay 同様、WT と F236W の結果は一致し、これと Hyper-TS mutant 以外の変異株はすべて Mot<sup>-</sup> mutant であった。温度変化に対する感受性は F236I/L が最も高く、続いて F236M, F236Y となり、これも swarm assay の結果と一致した。F236V は、固形の寒天培地上よりも液体培地中の方が、WT と比較した場合に温度の影響を受けやすいことが分かったが、これについては明確な理由を示すことができなかった。

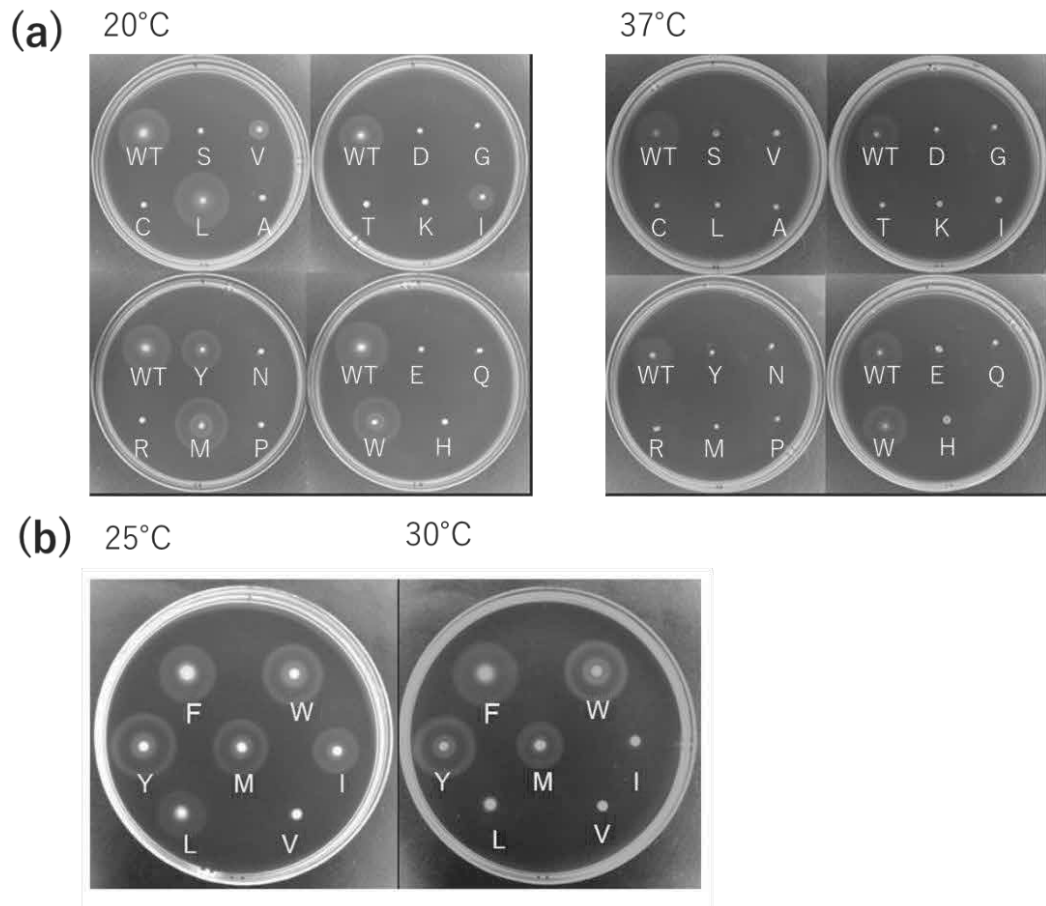


図 2-5 F236x 変異株の swarm assay

- (a) F236x は 0.3% の LB 寒天培地上に植菌後、20°C で 8~17 時間、あるいは 37°C で 4~7 時間培養した。
- (b) (a) で TS mutant であることが確認された 5 つの変異株と Mot<sup>+</sup> であった F236W, WT について、25°C, 30°C で swarm assay を行った。

表 2-4 20°Cおよび37°C条件下における F236x の温度感受性の評価

Swarm assay の結果をまとめた。swarm のサイズを WT の結果と比較して評価した。

表中にない変異株は, 20°C・37°Cどちらで培養しても swarm が観察されなかった。

Mutant	Swarming	
	20°C	37°C
F236F	++	++
F236W	++	++
F236Y	++	—
F236M	++	—
F236I	++	—
F236L	++	—
F236V	+	—

++; 75-100%, +; 1-75%, —; 0%

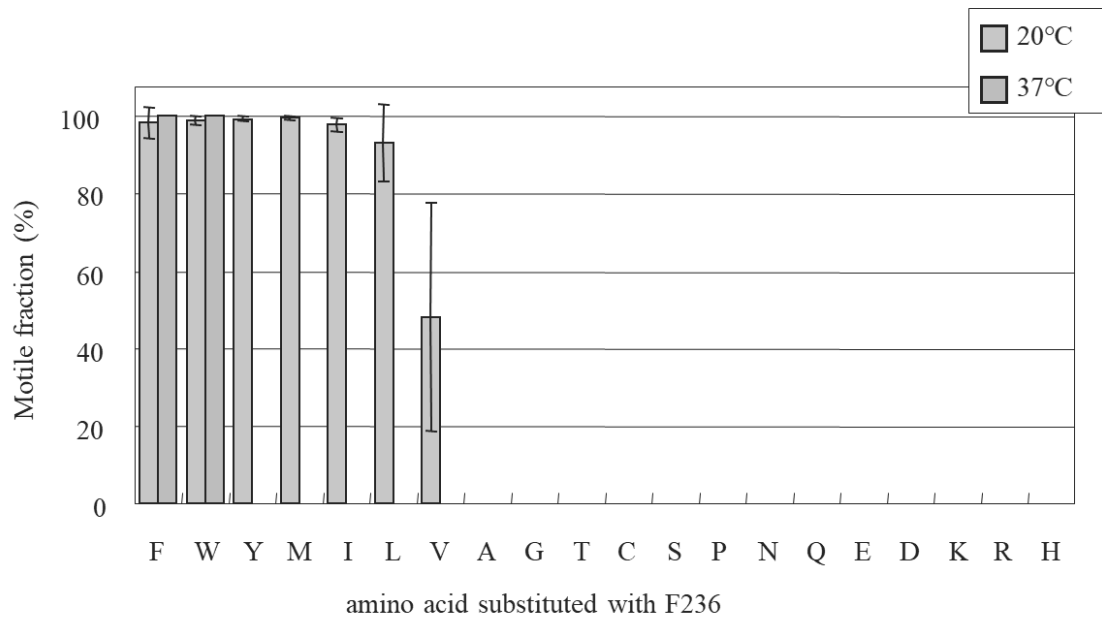


図 2-6 液体培中での F236x の温度感受性の評価

各温度で一晩振とう培養した変異株について、位相差顕微鏡で観察された個体のうち遊泳しているものの割合を求めた。F236W の遊泳能は WT と差がなかった。

表 2-5 F236x の温度変化に伴う遊泳能の変化

それぞれの変異株は 20°C で 1 晩振とう培養し、観察直前にクロラムフェニコールを添加し 10 分間反応させることで、その後のタンパク質合成を阻害した。

Mutant	20°C ⇌ 30°C			20°C ⇌ 37°C			20°C ⇌ 42°C		
	20°C	30°C	20°C	20°C	37°C	20°C	20°C	42°C	20°C
F236F	++	++	++	++	++	++	++	++	++
F236W	++	++	++	++	++	++	++	++	++
F236Y	++	++	++	++	++	++	++	+	++
F236M	++	++	++	++	+	++	++	—	++
F236I	++	+	++	++	—	++	++	—	+
F236L	++	+	+	++	—	++	++	—	+
F236V	+	—	+	+	—	—	+	—	+

Motile fraction : ++; 75-100%, +; 1-75%, —; 0%

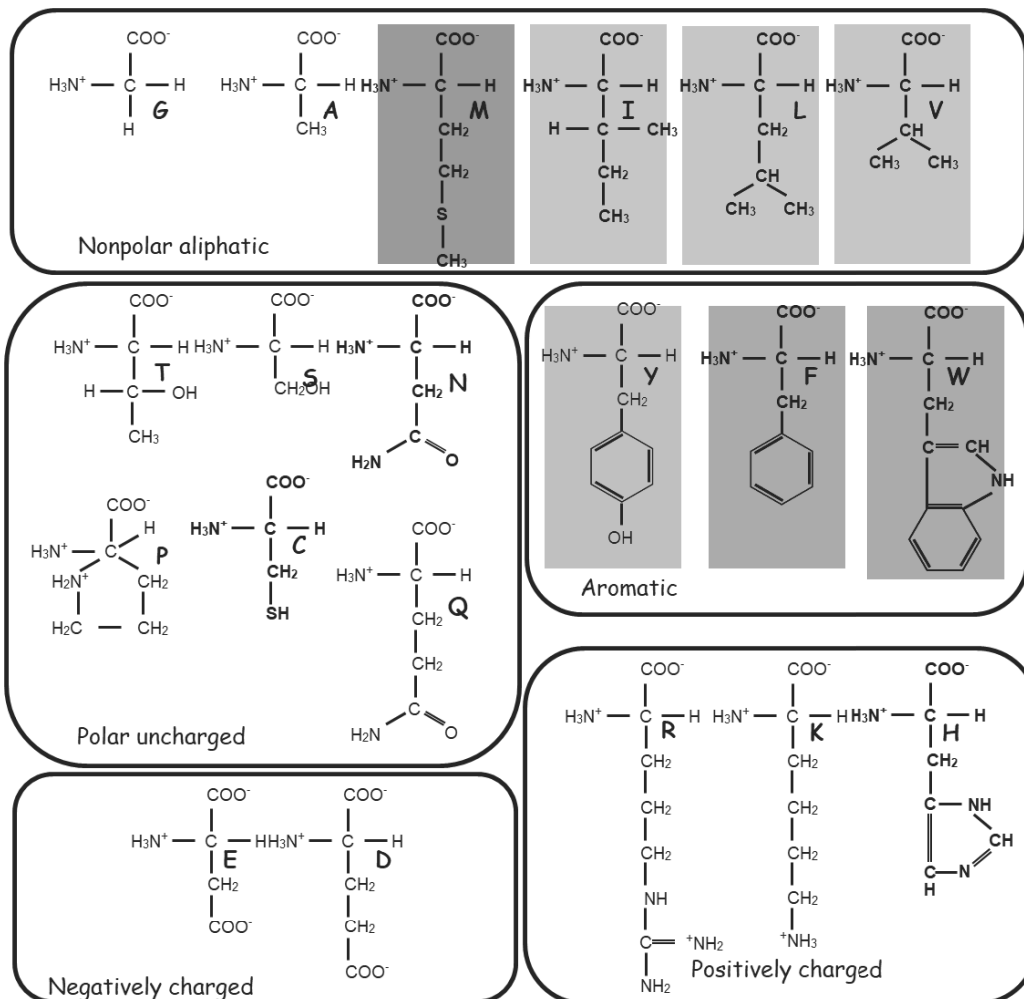


図 2-7 F236 に置換したアミノ酸の側鎖の特徴と変異株の温度感受性

赤で囲んだアミノ酸のうち、F は WT である。W への置換を受けた変異株は、WT と変わらない形質を示した。緑、青、黄で囲んだアミノ酸に置換した変異株は Hyper-TS mutant になり、黄 > 青 > 緑の順に温度感受性が高くなった。

## (2) D244x および K273x

温度変化へのべん毛モーターの感受性を、F236x の時と同様に swarm assay と液体培地中での遊泳能の変化から判定し、結果を表 2-6 と図 2-8, 表 2-7 と図 2-9 にそれぞれまとめた。

D244x では、WT である D244D と D244E/N/S の挙動が似通っていた。また、D244A/C/H は、42°Cまでの swarm assay では Mot<sup>+</sup>であったが、液体培地中では遊泳する個体の割合は減少した。温度変化に対する感受性実験でも、37°C, 42°C への一時的な温度変化によって、すべてではないが停止する個体があった。もしかしたら、さらに高温にさらすことで F236x の時に見られたような Hyper-TS mutant の性質を示すかもしれないが、菌体を高温にさらすことで物理的なダメージや生理的变化が起こる可能性も鑑みて、42°C以上での実験は行わなかった。D244G は swarm assay では WT と明確な違いは見られなかったが、液体培地中では Hyper-TS mutant の形質を示した。その他の変異株はすべて Hyper-TS mutant に特徴的な温度感受性を示し、D244P/Q/T/K/R はそのほかの Hyper-TS mutant よりも温度感受性がやや低いことが分かった。これらの結果から、D244 は正電荷をもつアミノ酸である K や R よりも負電荷をもつアミノ酸 (D や E) の方が、モーターの回転に関しては適していると考えられる。また、親水性残基である方が疎水性残基であるよりも、機能的には好ましいと考えられる。

K273x のうち、K273D/E は Mot<sup>-</sup> mutant になった。また、K273P/W は 37°C, K273Y/V は 42°Cで Mot<sup>-</sup>になり、これらに K273F を加えた 5 つの変異株が Hyper-TS mutant であった。K273C/H/G/I/N/S は 37°Cもしくは 42°Cで WT よりも液体培地中で遊泳する個体の割合が低下した。

K273 はドメインIIの疎水性コアから近傍にあるタンパク質のカルボニル酸素に面した位置に側鎖が伸びている (図 1-1, 図 2-1)。K273 は負電荷になるとモー



ターの回転を阻害すること，そして疎水性のアミノ酸残基に置換することで Hype-TS mutant となったことから，K273 は近傍のアミノ酸と相互作用しており，これにより疎水性コアの構造を安定化しているのではないかと推測される。

表 2-6 D244x 温度変化に伴う遊泳能の変化

それぞれの変異株は 20°C で 1 晩振とう培養し、観察直前にクロラムフェニコールを添加し 10 分間反応させることで、その後のタンパク質合成を阻害した。

Mutant	Motility assay						Response to temperature shift						
	Swarming motility			Swimming motility			20°C ⇌ 37°C			20°C ⇌ 42°C			
	20°C	37°C	42°C	20°C	37°C	42°C	20°C	37°C	20°C	20°C	42°C	20°C	
D244D	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
D244E	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
D244A	++	++	++	++	+	+	++	+	++	++	+	++	++
D244C	++	++	++	++	+	+	++	+	++	++	+	++	++
D244H	++	++	++	++	+	+	++	+	++	++	+	++	++
D244N	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++
D244S	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
D244G	++	++	++	++	+	+	++	+	++	++	-	++	++
D244P	++	+	+	++	+	+	++	+	++	++	-	++	++
D244Q	++	+	-	++	+	-	++	+	++	++	-	++	++
D244T	++	+	-	++	+	-	++	+	++	++	-	++	++
D244K	++	-	-	++	-	-	++	+	++	++	-	++	++
D244R	++	-	-	++	-	-	++	-	++	++	-	+	++
D244F	++	-	-	++	-	-	++	-	++	++	-	+	++
D244Y	++	-	-	++	-	-	++	-	++	++	-	++	++
D244M	++	-	-	++	-	-	++	-	++	++	-	++	++
D244I	++	-	-	++	-	-	++	-	+	++	-	+	++
D244V	++	-	-	+	-	-	+	-	+	++	-	+	++
D244L	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	++
D244W	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	++

Motile fraction: ++; 75-100%, +; 1-75%, -; 0%

表 2-7 K273x 温度変化に伴う遊泳能の変化

それぞれの変異株は 20°C で 1 晩振とう培養し、観察直前にクロラムフェニコールを添加し 10 分間反応させることで、その後のタンパク質合成を阻害した。

Mutant	Motility assay						Response to temperature shift						
	Swarming motility			Swimming motility			20°C ⇌ 37°C			20°C ⇌ 42°C			
	20°C	37°C	42°C	20°C	37°C	42°C	20°C	37°C	20°C	20°C	42°C	20°C	
K273K	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K273A	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K273C	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
K273G	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	+	++
K273H	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
K273I	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++
K273L	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K273M	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K273N	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	+	++
K273Q	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K273R	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K273S	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++
K273T	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
K273F	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
K273Y	++	++	-	++	+	-	++	++	++	++	++	-	++
K273V	++	++	-	++	+	-	++	+	++	++	++	-	++
K273P	++	-	-	++	-	-	++	-	++	++	++	-	++
K273W	++	-	-	++	-	-	++	+	++	++	++	-	+
K273D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K273E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Motile fraction: ++; 75-100%, +; 1-75%, -; 0%

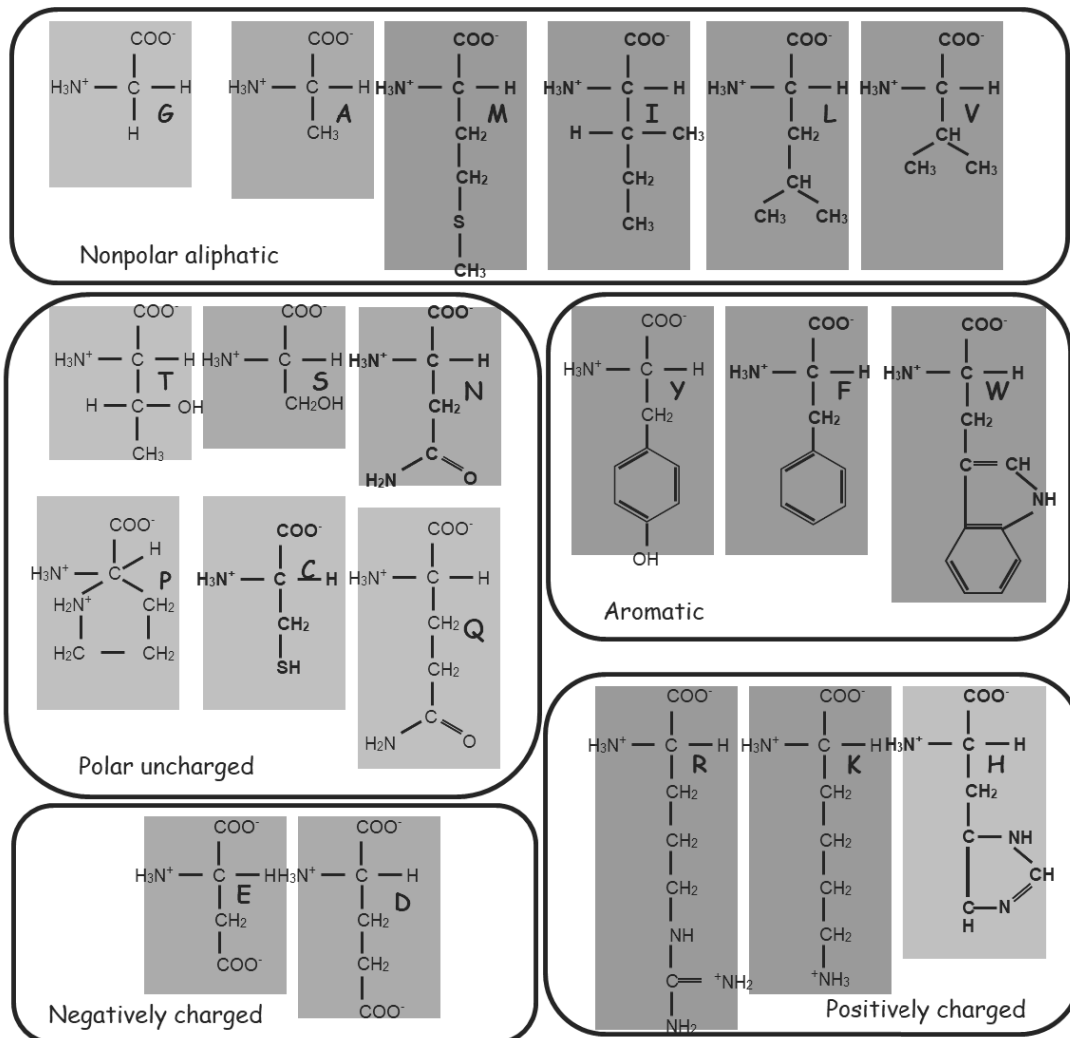


図 2-8 D244 に置換したアミノ酸の側鎖の特徴と変異株の温度感受性

赤で囲んだアミノ酸は、WT と変わらない形質を示した。緑，青，黄で囲んだアミノ酸に置換した変異株は Hyper-TS mutant になり，黄>青>緑の順に温度感受性が高くなった。

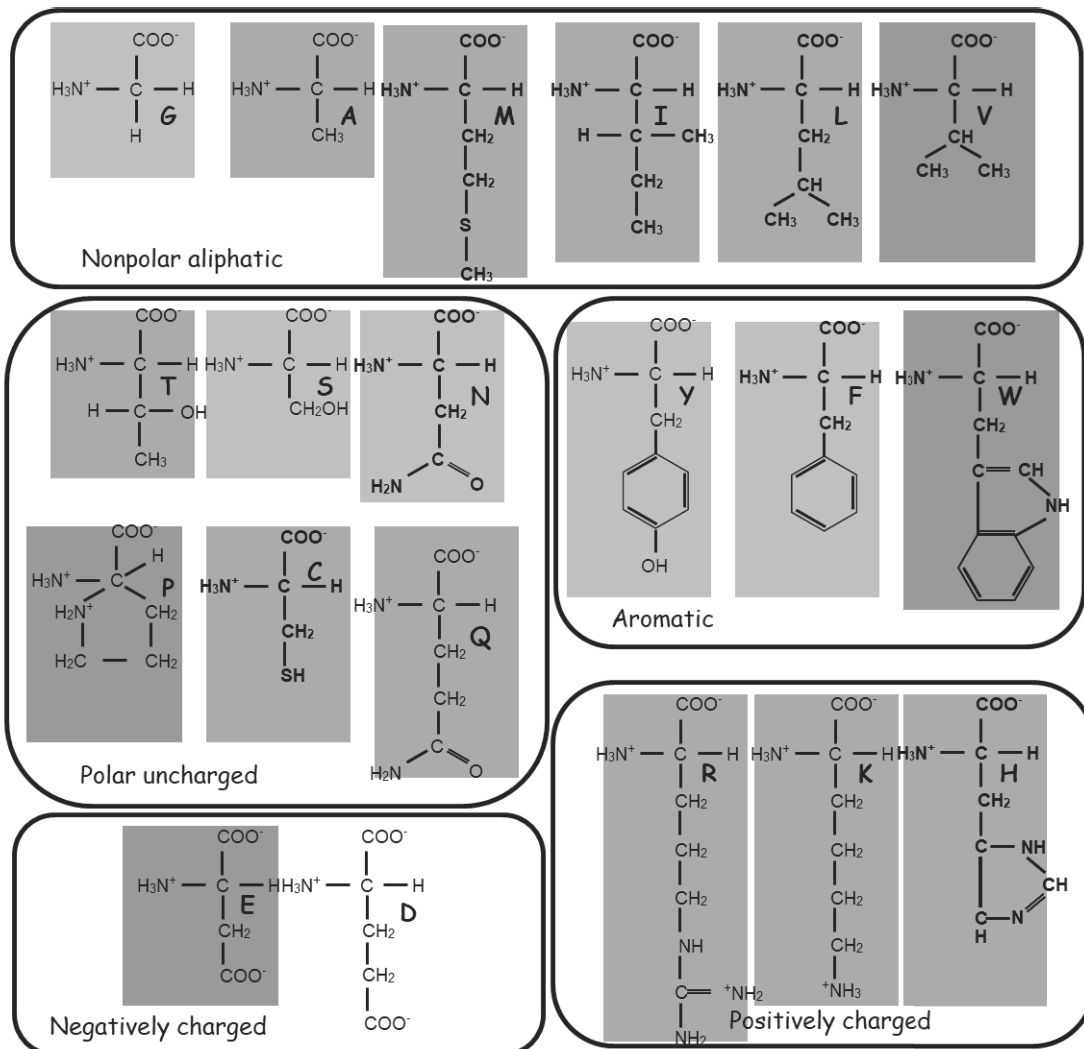


図 2-9 K273 に置換したアミノ酸の側鎖の特徴と変異株の温度感受性

赤で囲んだアミノ酸は、WT と変わらない形質を示した。緑，青，黄で囲んだアミノ酸に置換した変異株は Hyper-TS mutant になり，黄>青>緑の順に温度感受性が高くなった。

### (3) L260x

F236 から K273 の中間付近にあり、疎水性コア周辺にある L260 についてもアミノ酸を置換し、19 種の変異株を作成した。Swarm assay や液体培地での温度感受性実験を行った結果、L260R が Mot<sup>-</sup> mutant であった以外は、WT と同じ挙動を示した。R と同じ正電荷を持つ K に置換した場合でも Mot<sup>+</sup> になったことから、L260R では側鎖が長すぎたために近傍のアミノ酸との相互作用が起こり、モーターの回転が阻害されたのではないかと推測される。また、L260R は温度感受的にモーターの機能が回復することはなかった。おそらく、L260 は疎水性コアの安定性や回転トルクの発生には直接かかわらないアミノ酸であると考えられる。過去の報告によると、L259P/Q/R は Mot<sup>-</sup> mutant である (Irikura *et al.*, 1993; Mashimo *et al.*, 2007)。

#### 2-3-2 CD スペクトルの測定

変異 FliG を持つ変異株の温度感受性についてその原因を考察するために、WT の FliG ドメインII と Hyper-TS mutant である D244Y の変異 FliG を大腸菌の大量発現系を用いて単離・精製し、温度変化に伴う二次構造の変化を CD スペクトルの変化から予測した。

WT, D244Y どちらの場合もマイナスのピークが 208 nm と 222 nm に見られ、 $\alpha$ -helix rich な構造を持つことが分かる。測定時の温度を 15°C→25°C→35°C→45°C→15°C に変化させながら、CD スペクトルを測定した結果、温度変化による変化は少なく、WT と D244Y の結果を比較しても違いは見られなかった (図 2-10)。このことから、温度による大きな構造変化 (二次構造が変化するような変化) は起こっていないことが分かった。

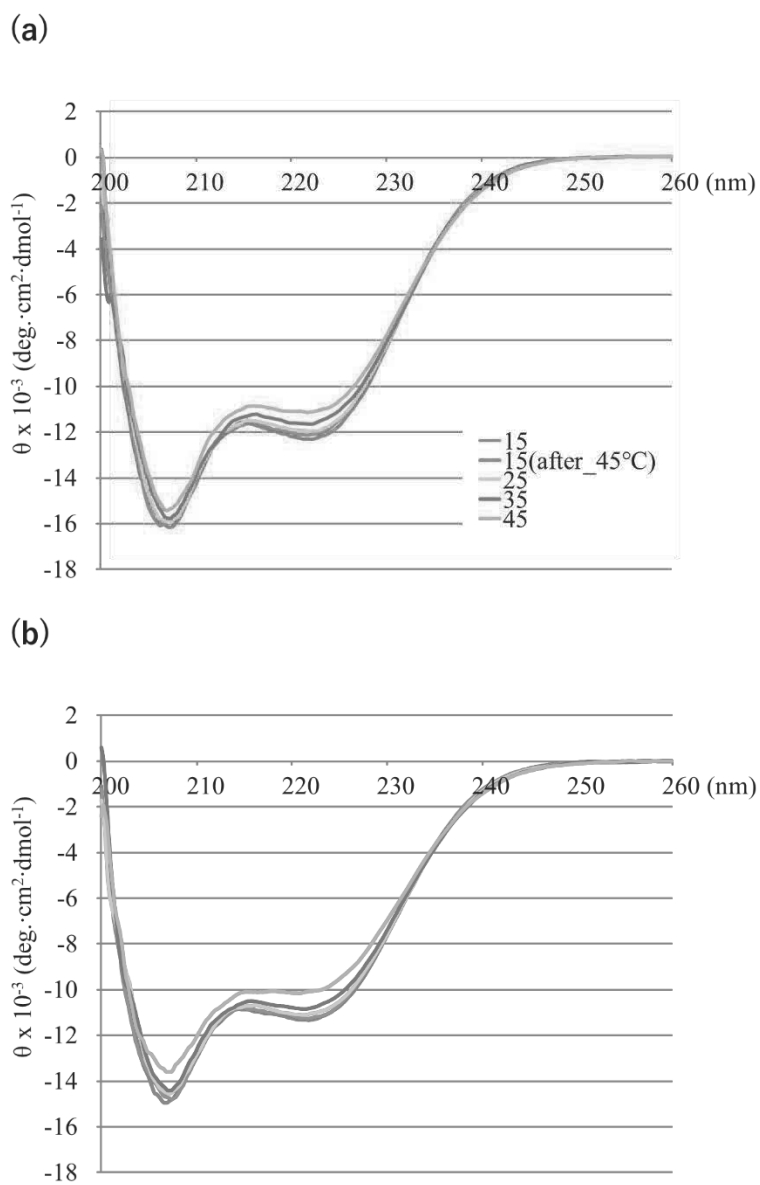


図 2-10 Flg ドメインIIの CD スペクトルの比較

WT と D244Y のドメインII (139 残基) を単離・精製し，測定温度を 15°C→45°C→15°Cにシフトさせたときの CD スペクトルを測定した。

## 2-4 考察

FliG には、べん毛構築・べん毛モーターのトルク発生源・モーターの回転方向の切り替えの、3つの役割があることが知られている。これまでの研究で、FliG の2つのドメインのうち、ドメインIはべん毛構築やべん毛モーターの回転方向の切り替えに関わっており、ドメインIIはトルク発生に直接かかわる領域を持つとされている (Irikura *et al.*, 1993; Sockett *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2002).

これまで FliG のどの領域がトルク発生に直接かかわっているかを特定するために、異種間で相同タンパク質のアミノ酸配列の比較や、自然発生した突然変異株や意図的に作成した変異株の解析が行われてきた (Lloyd *et al.*, 1996, 1999; Zhou *et al.*, 1998a, b; Irikura *et al.*, 1993)。保存性の高いアミノ酸として、電荷をもつアミノ酸 (charge-bearing ridge にある荷電残基 : K264, R281, D288, D289, R297) がピックアップされ、その部分のアミノ酸の変異株 (Wへの変異) が Mot<sup>-</sup>になったことから、charge-bearing ridge と固定子である MotA との静電気な相互作用がトルクを発生させるという考え方が主流になっている (Zhou *et al.*, 1998a, b)。しかし、意図的に作成した変異株以外に、この荷電残基に変異がみられる Mot<sup>-</sup> mutant は見つかっていない。また、Wへのアミノ酸置換がタンパク質の構造に対して影響を与えていないという証拠はない。たとえトルク発生に直接的は関わらない場所であったとしても、本研究にもみられたように間接的な影響を及ぼす場合もある。置換したアミノ酸の種類によって大きく結果が変わることもあり、W変異体だけの解析による現在の主流モデルは、不完全であると考えられる。

では、本研究で作成した変異株の解析で FliG のトルク発生について、新たにどのようなことが分かったのか。温度感受性実験の結果を表 2-8 にまとめた。また CD スペクトルの測定結果から、変異株の温度感受的な遊泳能の変化は、FliG



の構造全体に及ぶような構造変化を伴っていないことが分かった。図 2-11 にある空間充填モデルにあるように、F236 の側鎖は疎水性コアの内側を向き、D244 と K273 の側鎖は外側を向いている。F236 は疎水性アミノ酸以外に置換すると Mot<sup>-</sup> になり、置換したアミノ酸の側鎖のサイズが大きいほど、温度変化の影響を受けにくくなることが実験結果から分かった。このことから、F236 の側鎖が疎水性コアの全体構造を支える役割を持っていると予想される。以上のことから、疎水性コアの構造の安定がトルク発生には必要であること、コアの構造を支えているのが F236 であり疎水性の側鎖がその役割を担っていることが示された。F236 は間接的にトルク発生に関わっていることが示唆される。F236 はドメインIIの helix H と helix I をつなぐループ (3-10 helix) 上にある。異種間でアミノ酸を比較した場合も、M233 から E237 (M-F-L-F-E) のアミノ酸配列の保存性は高く、特に F234 と F236 が最も保存されている。ここからも、F236 がドメインIIの機能や構造の安定性に重要なアミノ酸であることがわかる。

一方、D244 と K273 はどちらも電荷の変化と親水性の変化によりモーターの形質変化が起こったことから、それぞれの側鎖近傍のアミノ酸との相互作用により、疎水性コアの安定性の維持に寄与しているのではないかと考えられる。

CD スペクトルの測定により、Hyper-TS mutant が温度に敏感に遊泳能を変化させる原因が、FliG の構造変化ではないことが示唆された。しかし、FliG は生体内で重合しリング状の構造をとっていることや、固定子である MotA, C リングを構成する FliM/N といったタンパク質と相互作用している状態でのわずかな構造のゆがみが、モーター全体の構造にどれくらい影響を与えるのかはわからない。重合した状態での構造の変化の程度を直接的に評価する方法が求められる。

今回の研究結果により、FliG のドメインIIが少なくとも 2 つの役割を持つ部分

から構成されていることが分かった。トルク発生に直接かかわる部分と、構造の安定に関わる部分である。Charge-bearing ridge がトルク発生を担う領域の有力な候補であることは変わらない。そして、構造の安定に関わる部分として、F236 が重要なアミノ酸であることは間違いない。変異株の疎水性コアはクラッチのような役割を持ち、温度が変化することで構造がわずかにゆがみ、一時的に charge-bearing ridge と MotA との相互作用が阻害されることでモーターの回転が停止するのではないかと考える。

表 2-8 アミノ酸置換変異株の形質

Mutant	Phenotype		
	Wild-type	Hyper-TS	Mot <sup>-</sup>
F236x	FW	Y>DILMV	ACDEGHKNPQRST
D244x	DENS	ACHGPQT>FIKLMRVWY	—
L260x	ACDEFGHIKLMNPQSTVWY	—	R
K273x	ACHIKLMQRT	GNS>FPVWY	DE

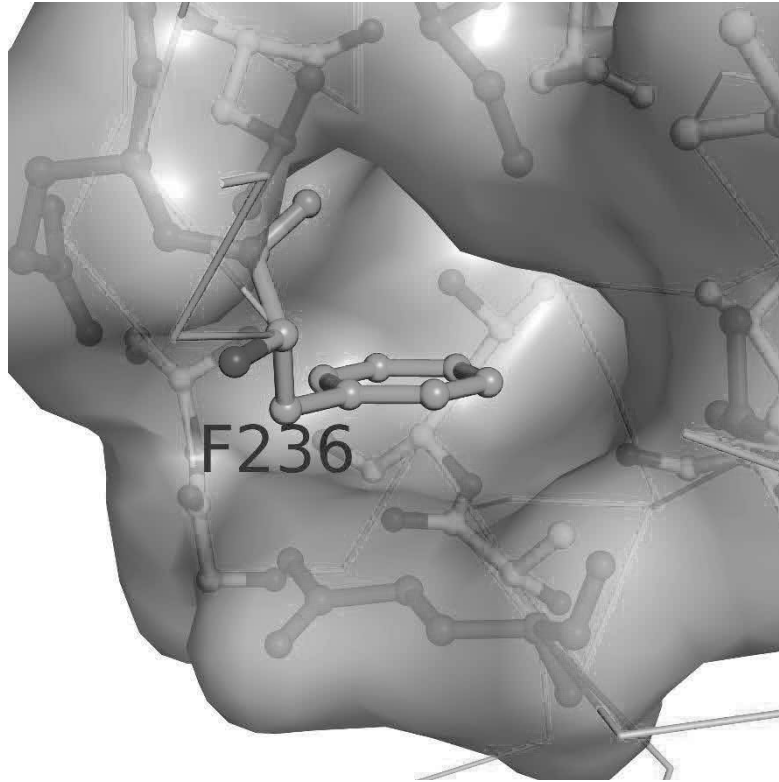


図 2-11 *Salmonella* ドメインIIに見られる疎水コアと F236 側鎖の位置

*T. maritima* FliG (PDB ID: 1LKV) をもとにアライメントした。アミノ酸番号は *Salmonella* のものを記載している。

## 参考文献

Aizawa, S.-I. (2009). Flagella. *Desk Encyclopedia of Microbiology*, 393-403.

Blair, K. M. Turner, L., Winkelman, J. T., Berg, H. C., Kearns, D. B. (2008). A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science*, 320, 1636-2638.

Bochner, R., Huang, H.-C., Schieven, G. L., Ames, B. N. (1980). Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J. Bacteriol.*, 143, 926-933.

Bochner, R., Huang, H.-C., Schieven, G. L., Ames, B. N. (1980). Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J. Bacteriol.*, 143, 926-933.

Fukuoka, H., Yakushi, T., Homma, M. (2004). Concerted effects of amino acid substitutions in conserved charged residues and other residues in the cytoplasmic domain of PomA, a stator component of Na<sup>+</sup>-driven flagella. *J. Bacteriol.*, 186, 6749-6758.

Irikura, V. M., Kihara, M., Yamaguchi, S., Sockett, H., Macnab, R. M. (1993). *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J. Bacteriol.*, 175, 802-810.

Kojima, S., Nonoyama, N., Takekawa, N., Fukuoka, H., Homma, M. (2011). Mutations targeting the C-terminal domain of FliG can disrupt motor assembly in the Na<sup>+</sup>-driven flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J. Mol. Biol.*, 414, 62-74.

Lee, L. K., Ginsburg, M. A., Crovace, C., Donohoe, M., Stock, D. (2010). Structure of the torque ring of the flagellar motor and the molecular basis for rotational switching. *Nature*, 466, 996-1000.

Lloyd, S. A., Tang, H., Wang, X., Billings, S., Blair, D. F. (1996). Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J. Bacteriol.*, 178, 223-231.

Lloyd, S. A., Whitby, F. G., Blair, D. F., Hill, C. P. (1999). Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature*, 400, 472-475.

Macnab, R. M. (1996). Flagella. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 123-145.

Makishima, S., Komoriya, K., Yamaguchi, S., Aizawa, S.-I. (2001). Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus. *Science*, 291, 2411-2413.

Maloy, S. R., Nunn, W. D. (1981). Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 145, 1110-1111.

Mashimo, T., Hashimoto, M., Yamaguchi, S., Aizawa, S.-I. (2007). Temperature-hypersensitive sites of the flagellar switch component FliG in *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 189, 5153-5160.

Sockett, H., Yamaguchi, S., Kihara, M., Irikura, V. M., Macnab, R. M. (1992). Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 174, 793-806.

Togashi, F., Yamaguchi, S., Kihara, M., Aizawa, S.-I., Macnab, R. M. (1997). An extreme clockwise switch bias mutation in *fliG* of *Salmonella typhimurium* and its suppression by slow-motile mutations in *motA* and *motB*. *J. Bacteriol.*, 179, 2994-3003.

Yakushi, T., Yang, J.-H., Fukuoka, H., Homma, M., Blair, D. F. (2006). Roles of charged residues of rotor and stator in flagellar rotation: comparative study using H<sup>+</sup>-driven and Na<sup>+</sup>-driven motors in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 188, 1466-1472.

Yamaguchi, S., Aizawa, S.-I., Kihara, M., Isomura, M., Jones, C. J., Macnab, R. M. (1986b). Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 168, 1172-1179.

Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S.-I., Macnab, R. M. (1986a). Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching. *J. Bacteriol.*, 166, 187-193.

Yorimitsu, T., Mimaki, A., Yakushi, T., Homma, M. (2003). The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor. *J. Mol. Biol.*, 334, 567-583.

Yorimitsu, T., Sowa, Y., Ishijima, A., Yakushi, T., Homma, M. (2002). The systematic substitutions around the conserved charged residues of the cytoplasmic loop of Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor component PomA. *J. Mol. Biol.*, 320, 403-413.

Zhou, J. Lloyd, S. A., Blair, D. F. (1998a). Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6436-6441.

Zhou, J., Sharp, L. L., Tang, H. L., Lloyd, S. A., Billings, S., Braun, T. F., Blair, D. F. (1998b). Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J. Bacteriol.*, 180, 2729-2735.



## 第3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

### 3-1 導入

テザードセルは、抗べん毛抗体などを用いてスライドガラスにバクテリアのべん毛を固定し、固定されたべん毛の基部にあるモーターを回転中心に回転する細胞のことである (Silverman *et al.*, 1974)。べん毛が回転していること直接的に証明した実験法であり、これまで多くの研究で、べん毛モーターの機能的特徴を調べるために利用されてきた。テザードセルの回転速度を測定することで、溶媒の種類や粘性がモーターの回転に与える影響を調べたり、トルク発生の有無の確認に用いられたり、べん毛モーターの機能を定性的・定量的に表現する手段として有効であると考えられてきた (Berg *et al.*, 1982; Block *et al.*, 1984; Khan *et al.*, 1985; Shimada *et al.*, 1987; Meister and Berg, 1987; Meister *et al.*, 1987; Blair and Berg, 1988; Berg and Turner, 1993, 1995; Fung and Berg, 1995; Samuel and Berg, 1995; Turner *et al.*, 1996; Ryu *et al.*, 2000)。本実験を実施した研究室においても、Cリングを部分的に蛍光標識した *S. typhimurium* のテザードセルを作成し詳細に観察することで、モーターが回転する様子や回転トルクの変化を直接的に確認する実験法の開発を目指していた。しかしその過程で、これまでのテザードセルに対する認識がいくつかの仮定の上に成り立つものであったことに気づき、観察結果を定量的に扱うことが難しいことがわかった。

べん毛研究の歴史において古くから利用されてきたテザードセルは、図 1-2 のようにフックによってスライドガラスの表面に対して平行になるように持ち上げられ、かつ、フックが完全な剛体であり、テザードセルが回転している間も菌体を安定して菌体を持ち上げ続けていること、回転モーターが常にテザードセ

ルの回転中心から動かないことを前提にされている。しかし、実際にテザードセルがこのような状態で回転していることを直接的に示した証拠はなく、長年の前提が事実と認識され、ユニバーサルジョイントであるフックの物性や菌体とガラス面との相互作用といった要因は重要視されてこなかった。また、テザードセルの観察時には、スムーズな回転を安定的に行っている細胞を選別して観察する手法がとられており、不安定に回転するその他多くのテザードセルの存在は無視されてきた。フックの硬さの測定を試みた研究では、べん毛回転によるねじれの方が働くことで、フックがわずかに曲がることは示されていたが (Block *et al.*, 1989), 単一のタンパク質 (FlgE) の重合体であるフック自体が剛体であるという認識は大きく変わることはなかった (図 3-1)。

一方でフックは、べん毛モーターで発生したトルクをべん毛繊維の回転へとスムーズに変換するために柔軟性を持っていなければならないという考え方も、並行して取り入れられてきた (Berg and Anderson, 1973; Macnab, 1996)。フックは剛体である、柔軟である、二つの考え方を生じさせる原因は何か？どちらが正解なのか？本研究では、テザードセル法の有効性の検証と、テザードセルにおけるフックの機能的役割からフックの物性を明らかとすることを目的として、蛍光顕微鏡を用いてテザードセルの詳細な観察を行った。

べん毛モーターの回転子である C リングを構成するタンパク質のうち、C リングのカップ状構造の細胞質側に重合する FliN, に注目し、蛍光タンパク質である YFP で標識した。FliN は FliG・FliM とともにべん毛モーターの C リングを構成している (図 1-1, Khan *et al.*, 1992; Francic *et al.*, 1994)。これらはスイッチタンパク質とも呼ばれ、べん毛モーターの回転方向の切り替えに関わっている。シグナル伝達タンパク質である CheY がリン酸化されスイッチタンパク質の複合体に結合すると、べん毛モーターは回転方向を切り替えることが分かっている。

*Salmonella* の場合、菌体から見てべん毛は反時計回りに回転することで菌体表面から伸びる複数のべん毛繊維が束になる。束になったべん毛繊維の回転による推進力により、直線的な遊泳が可能になっている。また、べん毛モーターは化学物質等の刺激を感知すると回転方向が一時的に逆転させ、べん毛の束をほどく。これにより個々のべん毛がそれぞれ違う方向に広がり、菌体は停止・方向転換(タンブリング)を行うことができる。またCリングは、べん毛構築時に細胞外へ関連タンパク質を分泌するために必要な構造であることも分かっている。

YFP-FliN を発現する *Salmonella* を作成し、テザードセル法により回転中の細胞における YFP の蛍光の挙動を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、回転中のテザードセルにおいて、YFP の傾向は常に中心にあり続けるのではないことが分かった。すなわち、テザードセルは旋回していることが分かった。また、回転中心と予想されるポイントから実際の YFP の挙動がどれくらいずれているかを測定したとこと、フックの長さはずれの大きさに一定の関係性があることが分かった。さらに、一定時間当たりの回転角を求めたこと、明らかに菌体がガラス表面に接触している様子が見られた。これらの結果から、テザードセルにおけるフックの役割について考察する。

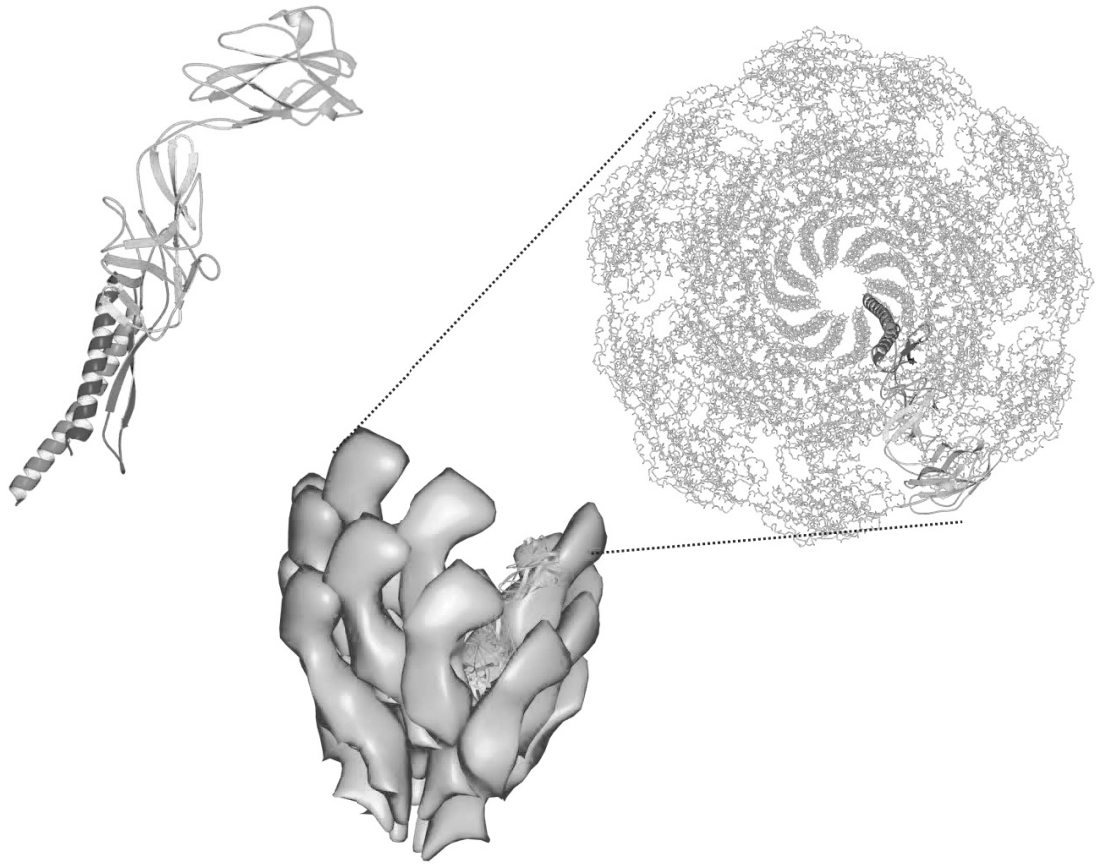


図 3-1 *Salmonella* フックタンパク質 FlgE と重合によるフック形成

(PDB ID: 6KFK)

## 3-2 方法

### (1) 菌株および生育条件

本実験に用いた菌株およびプラスミドは、表 3-1 にまとめた。pTrac99AFF4 由来のプラスミドを導入された菌株は、アンピシリン 50 µg/mL を含む LB 培地で培養した。培養温度は 37°C であり、必要に応じて 50 µg/mL になるように IPTG を添加した。

### (2) YFP-FliN キメラタンパク質を発現する *Salmonella* の作成

pAH3 (表 3-1) を利用し、FliN の C 末端側に YFP が接続したキメラタンパク質を発現する pAH24 を作成した。使用したプライマーの配列は下の通りである。

iNBsrRv : 5'-gaatgaggactgtacaagatgagtgacatg-3' (下線部は BsrGI 認識サイト)

iNBamFd : 3'-ccgtggcttggatcctcatcattaacg-3' (下線部は BamHI 認識サイト)

PCR 法で増幅した DNA 断片と pAH3 をそれぞれ BsrGI と BamHI で切断し、DNA リガーゼで連結したものを pAH24 とした。

pAH24 はエレクトロポレーション法により表 3-1 にある *Salmonella* 種に遺伝子導入した。(1)にある条件で選抜後、IPTG により遺伝子発現が誘導されることを確かめた。

### (3) ウェスタンブロッティング

作成した遺伝子導入株を LB 液体培地に植菌し 1 晩振とう培養した。別の LB 培地に対して培養液を 100 分の 1 濃度になるように植え替え、IPTG が 0.1 mM になるように添加した。37°C で振とう培養し、0 時間後、3 時間後、6 時間後の菌体をそれぞれ回収した。それぞれの菌体を濃度が同じになるように水で再懸濁し、SDS-PAGE 用のサンプルバッファーを加えて 2 分間加熱した。SDS-PAGE

(12 % (w/v) ポリアクリルアミドゲル) により、菌体内で発現するタンパク質を分離した。ゲル内で分離・展開したタンパク質を, polyvinylidene fluoride membrane (Immunobilon-P, Millipore) に転写し, 抗 FliN 抗体で検出した。検出には ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を使用した。

#### (4) 蛍光顕微鏡による観察

倒立蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U, Nikon) で菌体を観察し, べん毛モーターに組み込まれた YFP-FliN の蛍光の挙動を調べた。対物レンズとして 100×1.45-NA Nikon Plan Apo objective lens を使用し, 光源には 100 W の水銀ランプを用いた。蛍光フィルターとして YFP-HQ (Nikon) を装着し, 菌体の像を EM-CCD camera (DIGITAL CAMERA C9100, HAMAMATSU) により撮影した。Aqua Cosmos 2.6 software (HAMAMATSU) を使用して撮影した映像をコンピューターに取り込み解析した。

テザードセルの回転中心にある蛍光スポットと, そこから離れた位置にある蛍光スポットを選び, 外側のスポットの動きから, 時間ごとの回転角の大きさ ( $\cos \theta$  で表現する) を求めてグラフ化した。ある時点での外側にある蛍光スポットの座標を  $(X1, Y1)$ , 28 mS 後 (動画 1 フレーム) の座標を  $(X2, Y2)$  としたとき,  $\cos \theta$  は以下の式で求めた。

$$\cos \theta = (X1X2 + Y1Y2) / (X1^2 + Y1^2)(X2^2 + Y2^2)^{1/2}$$

#### (5) テザードセルの作成

すべての菌株は, 50  $\mu\text{g/mL}$  のアンピシリンを含む LB 液体培地中で 1 晩振とう培養した。別の LB 培地に対して培養液を 100 分の 1 濃度になるように植え替え, IPTG が 0.1 mM になるように添加した。3~4 時間振とう培養したものを

回収し、パスツールピペットで 1 分間懸濁した。これにより、べん毛の長さを短くし、菌体当たりのべん毛数を減らした。このように処理した培養液から遠心分離により菌体のみを回収し、1% (w/v) NaCl で 2 回洗浄後、再懸濁した。

スライドガラスもしくはポリスチレン製のマイクロビーズ (直径 200 nm) の表面に吸着させた抗フラジェリン抗体 (Hi もしくは H1 抗体) により、テザードセルを作成した。実験に使用した *Salmonella* のうち、SJW strain はべん毛繊維が FliC のみの重合体であるため Hi 抗体を使用し、TH strain のべん毛繊維は FliC と FliB の 2 種類のタンパク質を含むため、Hi 抗体と H1 抗体を混合して使用した。抗体は PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で希釈した。

スライドガラスにガラスに抗体を 1 滴のせ、カバーガラスをのせた。カバーガラスの側面から隙間に PBS を流し込み、それとは逆側の側面からろ紙で余分な PBS とガラスに吸着しなかった抗体を吸い取った。べん毛を短く処理した菌液 20  $\mu$ L を先程と同じ要領でガラス同士の隙間に流し、さらに PBS を流し込みながらろ紙で余分な液体と抗体でトラップされなかった菌体を吸い取った。出来上がったプレパラートを蛍光顕微鏡で観察し、テザードセルが回転する様子を観察した。

マイクロビーズ上でのテザードセルを観察するために、マイクロビーズに抗体を吸着させた。マイクロビーズを PBS に懸濁し、抗フラジェリン抗体を加えて 30 分室温で放置した。PBS で 2 回洗浄し余分な抗体を上澄みから取り除き、実験に使用した。スライドガラスにマイクロビーズを 1 滴落とし、カバーガラスをかけた。以降は、スライドガラス上にテザードセルを作成するときと同じ要領でテザードセルを作成し、蛍光顕微鏡で観察した。マイクロビーズと菌体が重なった状態で回転する細胞をマイクロビーズ上で回転するテザードセルであると判断した。

#### (4) 電子顕微鏡によるフックの長さの測定

フックの長さを測定するために、菌体からべん毛の全構造 (C リング, MS ring, フック, べん毛繊維) をそのままの状態でも分離した。(ref) べん毛繊維を構成するフラジェリンを脱重合させることで、べん毛モーターとフックだけの構造体を回収した。回収した資料は氷上でよく冷やし、2% (w/v) phosphotungstic acid (pH4.0) でネガティブ染色した。低温・酸性条件下で染色することで、かぎ状に曲がっていたフックをまっすぐに伸ばすことができるので、これを電子顕微鏡 (JEM-1200EXII, JEOL) で観察し写真に収めた。現像した写真を使って、フックの長さを計測した。



表 3-1 本研究で用いた菌株とプラスミド

Strains or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<b><i>Escherichia coli</i> strain</b>		
NovaBlue	General cloning strain	Novegen
<b><i>Salmonella</i> strains</b>		
SJW1103	Wild-type	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1986a
SJW2342	$\Delta$ <i>fliN</i> mutant	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1986b
TH9543	Short hook mutant	Saito <i>et al.</i> , 1998
TH9541	Short hook mutant	Shibata <i>et al.</i> , 2007
TH8256	Long hook mutant	Shibata <i>et al.</i> , 2007
TH8257	Long hook mutant	Shibata <i>et al.</i> , 2007
<b>Plasmids</b>		
pTrc99AFF4	Cloning vector	Onishi <i>et al.</i> , 1997
pAH3	pTrc99AFF4-eYFP	Hirano <i>et al.</i> , 2005
pAH24	pTrc99AFF4-eYFP- <i>fliN</i>	This study

### 3-3 結果

#### (1) 菌体内での YFP-FliN キメラタンパク質の発現と機能の確認

pAH24 を遺伝子導入した *Salmonella* が YFP-FliN を発現していることを確かめるために、抗 FliN 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。WT である SJW1103 と *fliN* である SJW2342 内で YFP-FliN が発現することが確認でき、どちらの菌株においてもその発現量に差がないことが分かった (図 3-1 (a))。また、SJW1103 と比較しても、YFP-FliN を発現する菌株では 1 個体あたりのべん毛の本数や長さに違いは見られなかった (data not shown)。SJW2342 はもともとべん毛が構築されない (Fla<sup>-</sup>) 菌株であるので、YFP-FliN によってべん毛構築能が回復したことになる。したがって、発現した YFP-FliN が通常に FliN 同様に C リング内に組み込まれ、連結した YFP がべん毛の構築に対して阻害的に働かないことが確認された。また蛍光顕微鏡下で菌体を観察したところ、どちらの菌株でも複数の蛍光スポットが確認された(図 3-1(b))。もともと FliN を発現している SJW1103 においても、SJW2342 よりも蛍光強度はやや低いと同様のスポットがみられた。これは、C リング内に FliN と YFP-FliN の両方が含まれているためと考えられる。テザードセルの観察により、複数ある蛍光スポットのうち 1 点を中心に菌体が回転していたため、YFP が連結した状態であっても、FliN はモーターの一部として機能することがわかった(図 3-2)。

一方で、*yfp* を *fliN* の C 末端側に連結した場合、FliN-YFP キメラタンパク質が発現した SJW2342 ではべん毛の構築は回復したが、べん毛が回転する様子は見られなかった。つまり、FliN-YFP が組み込まれた C リングはべん毛構築には正常に働くことができるがモーターとしての機能は持たないことになり、YFP がモーターの回転あるいはトルク発生に対して障害になっていることを示唆している。しかしながら、YFP-FliN あるいは FliN-YFP を発現している SJW2342

からべん毛モーターの基部体を単離し電子顕微鏡で観察してもその構造に明らかな違いは見られず、YFP が回転に対してどうやって阻害的に働くのかはわからなかった。また、YFP-FliN よりも FliN-YFP のほうが同じ発現系を用いても発現量が高く、FliN-YFP を発現する個体ではべん毛の本数が増えていた (data not shown)。この理由についても明らかにできていない。

以上の結果から、以降の実験には YFP-FliN 発現株を用いることにした。また、FliN が正常であるがべん毛の構造に異常がある菌株を用いた実験を行うことも考慮し、pAH24 を導入した SJW1103 を用いて実験を進めることにした。

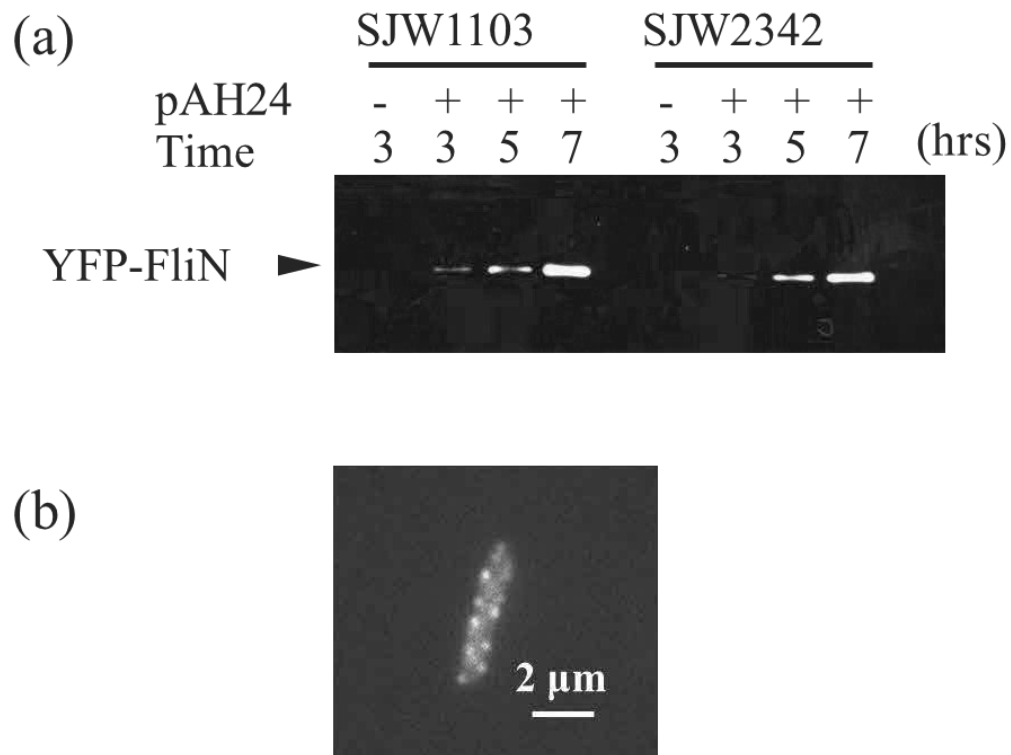


図 3-1 YFP-FliN の発現

(a) pAH24 導入株に IPTG 添加後, 3, 5, 7 時間後の YFP-FliN の発現量を調べた。

SDS-PAGE 後, 抗 Hi 抗体 (抗フラジェリン抗体) を使ったウェスタンブロットを行い, IPTG により発現が誘導されることを確認した。

(b)  $\Delta fliN$  である SJW2342 で発現する YFP-FliN を, 蛍光顕微鏡で確認した。YFP の蛍光によるドットの位置がべん毛モーターの位置を表している。

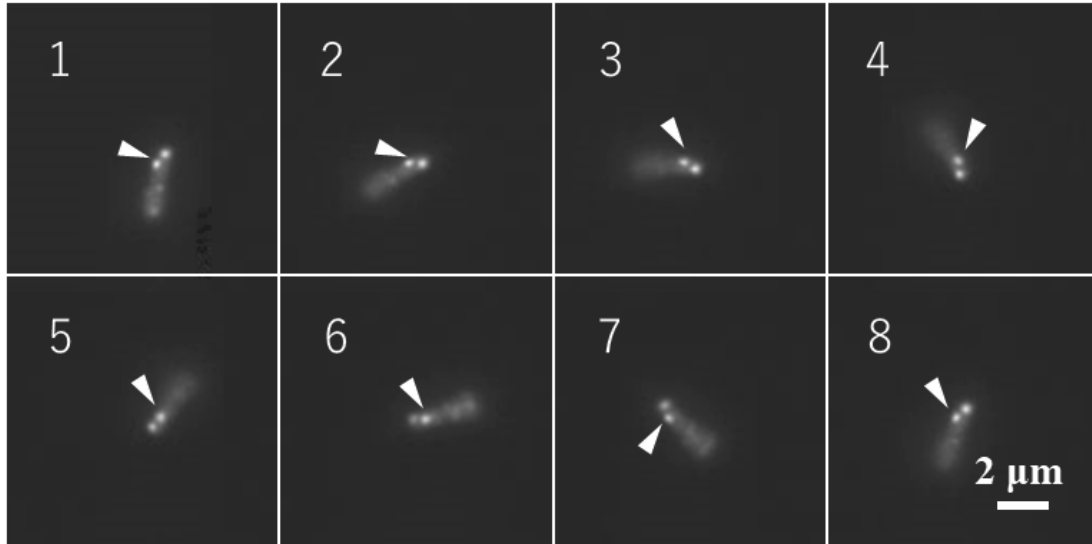


図 3-2 YFP-FliN を発現する SJW1103 によるテザードセルの回転

回転する菌体を 41 ms おきに撮影し並べた。矢印はテザードセルを回転させている，中心付近のモーター位置を表している。SJW1103 のモーターには，YFP-FliN と FliN の両方のタンパク質が含まれている。

## (2) 回転中心のずれとフックの長さとの関係

テザードセルを用いた実験や観察は通常、回転中心が菌体の中心付近にあり、できるだけスムーズに回転しているように見える個体を選んで行っている。しかし実際にはそのような菌体ばかりではなく、不安定な回転をしているテザードセルが観察されることが多い。本実験においても、上記のような条件でスムーズに回転するテザードセルを選び観察を行っていたが、回転中心にある蛍光スポットの動きや細胞内のその他のスポットの変位を解析すると、その回転は見た目と違って不安定であることが分かった。

テザードセルの回転中心にある蛍光スポットの動きを CCD カメラで録画し、1 フレーム (およそ 28 mS) ごとの位置を座標軸上にプロットしたところ、50 から 200 nm 程度の半径で中心自体が円運動していることが分かった (図 3-3)。蛍光の揺らぎによる測定誤差を考慮するために、SJW2342 内で発現した YFP-FlhN の蛍光スポットについても確認した (図 3-3 (a))。完全に停止している菌体を選抜してスポット位置の変化を座標軸上にプロットしたところ、半径 20 nm 程度の幅で蛍光スポットのピークが動いていた。Fukuoka *et al.* (2007) の報告で、回転子に組み込んだ蛍光標識が、同様に ~20 nm の幅で揺れ動く現象が確認されていることから、この 20 nm 幅の動きは、蛍光の揺らぎによる測定誤差であると認識できる。

また、回転中心にある蛍光スポットと、そこから離れた場所にある蛍光スポット位置を同時にプロットした場合、2 点間の距離が変化していた (図 3-4(a))。そして、中心から離れた位置にあるスポットは、楕円軌道を描いていた。これは、菌体がスライドガラス面に平行に回転するのではなく、面に対して傾いた状態で回転していることを表している。また 1 フレームごとの回転角が一定ではないこともわかった (図 3-4 (b))。一定時間ごとに回転の速さが落ちるタイミン

グがあり (図中矢印位置), 図 3-4 (a)の結果も踏まえると, 菌体のガラス面に対する角度が速さに影響したと考えることが妥当である。

ここまでの結果から, テザードセルのイメージである, 「剛体であるフックによって菌体がガラス面に対して平行に持ち上げられ, 一定の距離を保ったまま同心円状に回転している」という前提は成立していない可能性が生じた。テザードセルを回転させているモーターの蛍光スポットがわずかに回転する理由は, 「フックが完全な剛体ではなく, ゴムホースのように柔軟に曲げの方向を変えることができるため」であり, 「フックが柔軟なために, 回転している菌体を常に同じ角度で支えることはできないのではないか」と予測した。回転の速さが変化した原因は, 傾いた菌体がガラス面に接触しているためではないかとも考えられる。しかし, 菌体の回転によって加わったねじれの力により, 剛体であるフックに力が蓄積され, これが解放されることで回転の速さが変化する可能性もあったため, フックの長さや形が異なる変異体を用いてさらに実験を行うことにした。

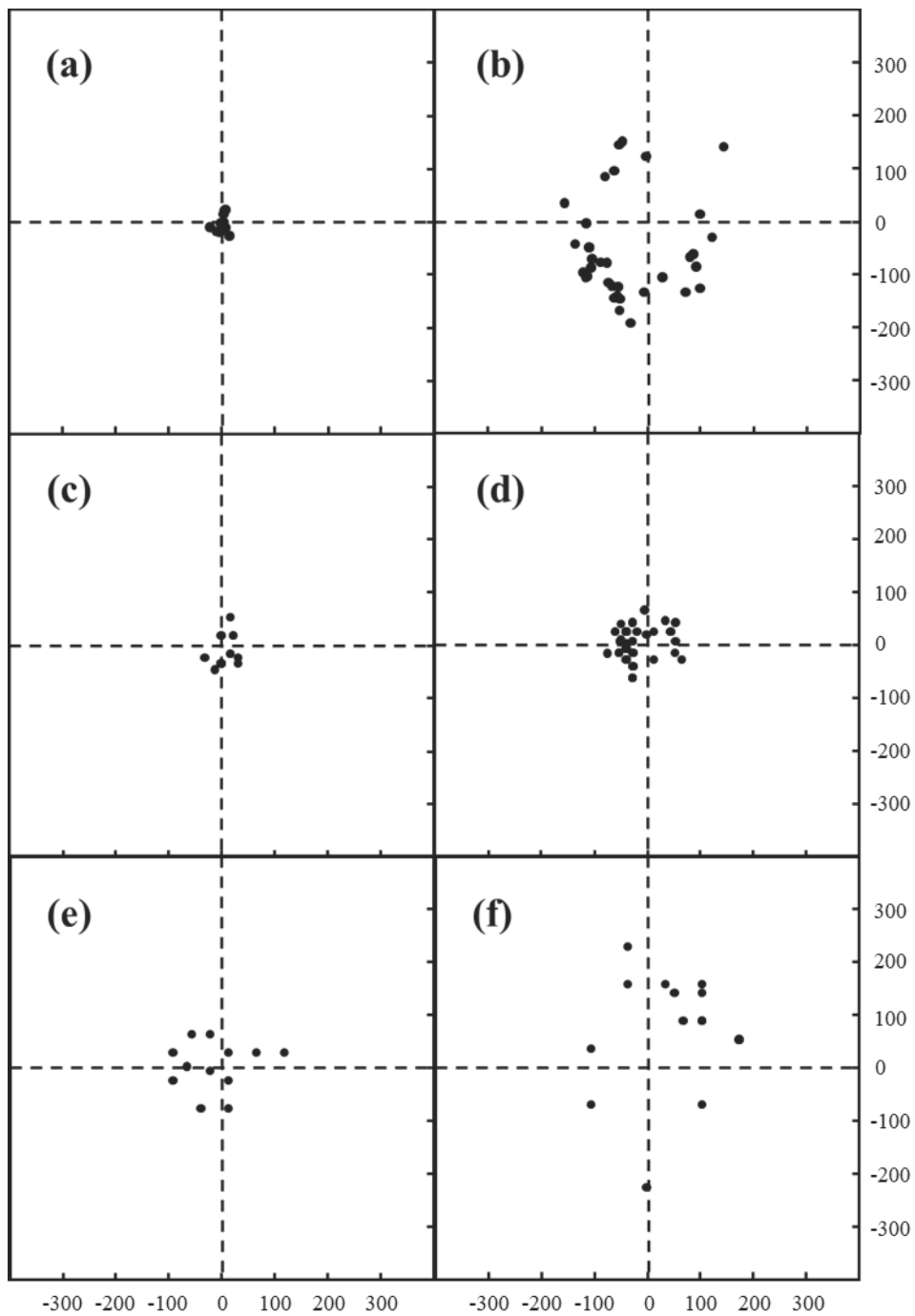


図 3-3 テザードセルの回転するモーターに標識した YFP の軌跡

(a) 固定された SJW2342。YFP 自身の揺らぎによる測定誤差を表す。

(b) 回転する SJW2342。

(c) ~ (f) 回転する SJW1103。



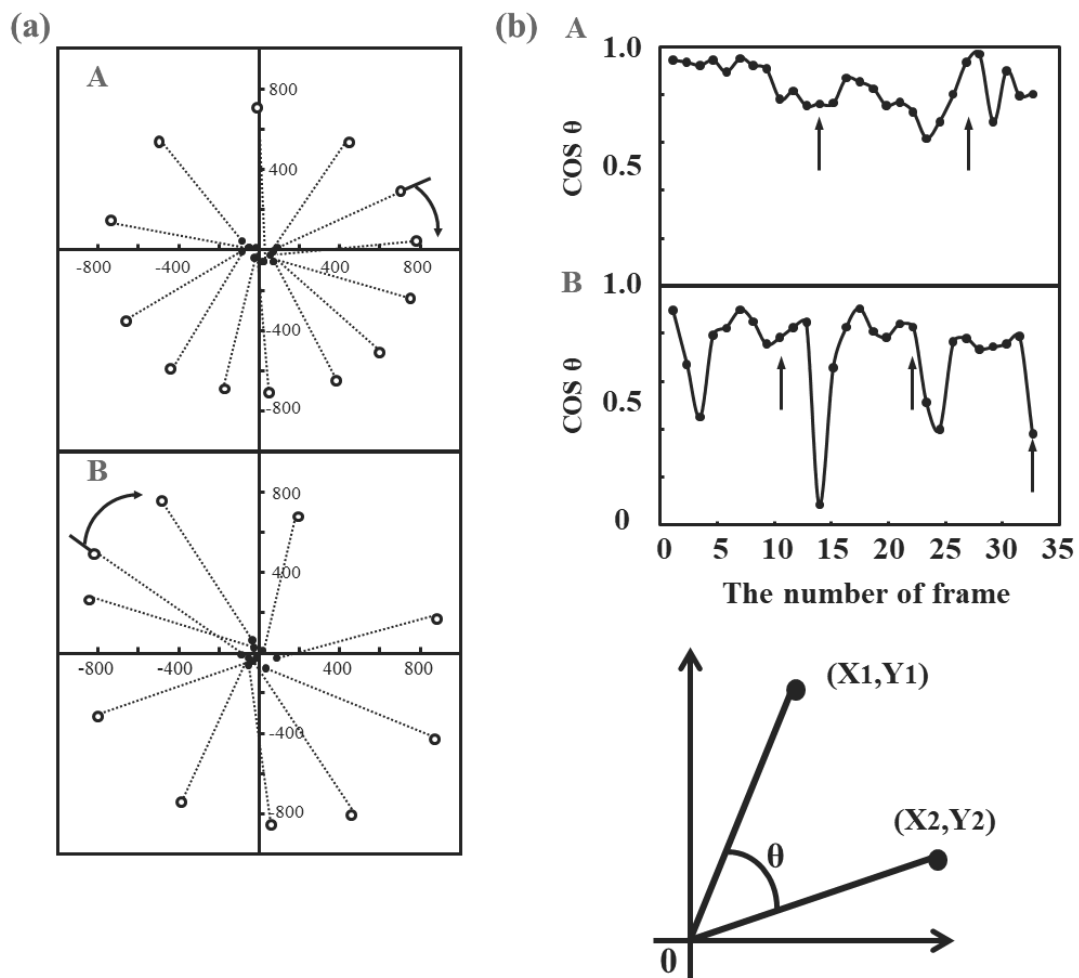


図 3-4 テザードセルの回転角の変化

(a) 回転の中心にあるモーター (黒)とそこから離れた位置にあるモーター(白)の軌跡をトレースした。点線でつながれた2点と同時に観察されたものである。

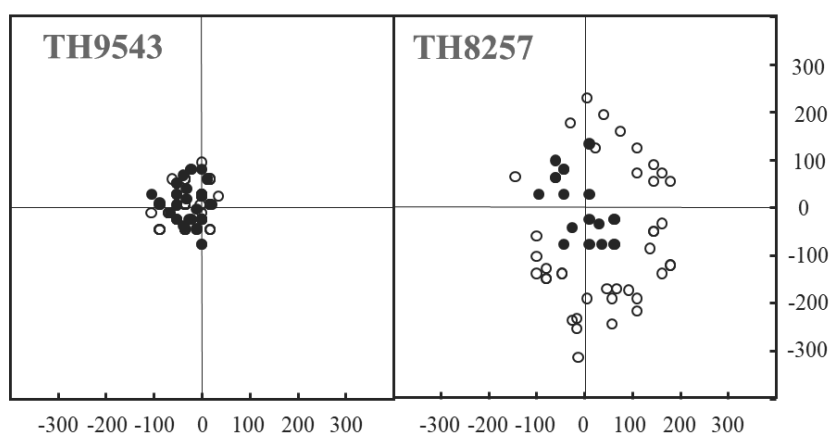
(b) (a)の 28 mS おきの回転角を  $\cos \theta$  で表し、その変化をグラフ化した (1 frame = 28 mS)。計算方法は方法に記載した。A・Bはそれぞれ、(a)のグラフ A・B の作成時に観察したテザードセルについての結果である。

### (3) フックの長さがテザードセルの回転に与える影響

図 3-3 で見られた蛍光スポットの回転の原因がフックの柔軟性によるものであるかを確認するために、フックの長さを変えることで回転半径が変化するかどうかを調べた。SJW1103 のフックの長さは  $55 \pm 5.9$  nm である (Shibata *et al.*, 2007)。これより短いフック ( $42.6 \pm 4.9$  nm) を持つ変異体である TH9543 と、長いフック ( $63.8 \pm 5.7$  nm) を持つ変異体である TH8257 に pAH24 を遺伝子導入し、実験を行った。TH9543 と TH8257 はフック長を調整する機能を持つ FliK の変異株である (Shibata *et al.*, 2007)。

TH9543 では、蛍光スポットの回転半径が 100 nm 以内で抑えられたのに対して、TH8257 では 300 nm 近くになることもあった (図 3-5(a))。また TH9543 で実験を行った場合、ガラス面と平行に回転しているように見えるテザードセルの絶対数が少なく、明らかに斜めに傾いて回転しているものが多かった。これは、短いフックのせいで菌体がガラス面から十分持ち上げられず、距離をとって回転できないためと考えられる。TH9543 と TH8257 以外にも、フックの長さが異なる変異株を用いて実験を行ったところ、フックの長さと回転半径の大きさの間に相関関係がみられた (図 3-5(b))。以上の結果から、フックは柔軟性を持った構造体であり、この柔軟性がテザードセルの回転を不安定にする原因であることが示唆された。

(a)



(b)

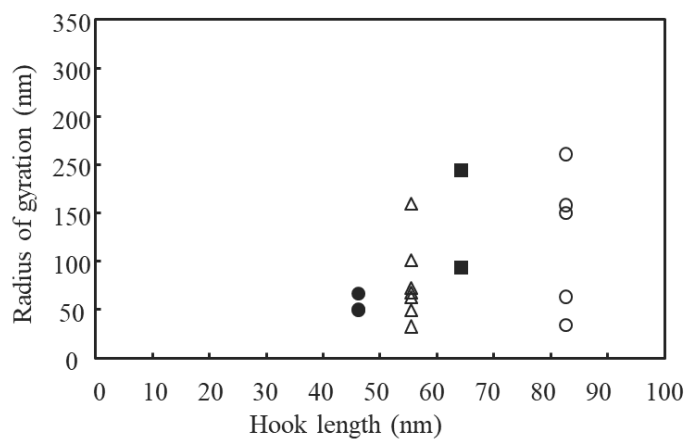


図 3-5 テザードセルの中心付近にあるモーターの旋回の半径とフックの長さの関係

(a) TH9543 (short hook mutant)と TH8257 (long hook mutant) の回転モーターの動き。

グラフ 1 メモリは 100 nm であり, 2 個体の観察結果をそれぞれ記載している。

(b) フックの長ささと旋回半径。フックの長ささと旋回の半径の間には, 正の相関関係

がみられた。▲/△: WT と同じ長さのフックを持つ個体, ●: short hook mutant, ■/

○: long hook mutants

#### (4) テザードセルのガラス面との接触について

これまでの研究テザードセルを作成した場合、多くの菌体は目に見えて分かるほどの異常な回転をするため、定性的・定量的な実験に用いられることはなかった。しかし、テザードセルの実態を理解するには、このような異常な菌体についても十分な分析が必要である。図 3-6 (a) / (c)は、フックが短い変異体である TH9541 を用いた実験の結果である。白抜きのドットが回転中心付近の蛍光スポットの動きを表し、黒のドットがそれよりも離れた位置にある蛍光スポットの動きをトレースしたものである。図 3-6(a)を見ると、外側のスポットと中心付近のスポットが重なるタイミングと、二点間の距離は一定ではなく、距離が最も離れるタイミングで回転の速さが遅くなっていることが分かる。光学顕微鏡下で回転する菌体の様子と蛍光スポットの動きから、この菌体は 1 回転あたり 3 回ガラス面と接触することで減速していると考えられる。べん毛を固定した状態で 3 回ガラス面に菌体がぶつかるには、フックが柔軟に揺れ動く必要がある (図 3-6(b))。また図 3-6(c)では、同一の旋回中心を持ちながら、外側のスポットの軌道が変化している。これは、ガラス面に対するフックの傾きが変わることを示している (図 3-4 (d))。フックが柔軟に曲がることがなければ起こらない現象である。

以上の結果からも、フックは柔軟性に富む構造体であり、テザードセル状の菌体はガラス面と接触しながら回転することが通常であるということが支持された。また、テザードセルの回転の速さが変化したのは菌体とガラス面との接触が主な原因であるので、一見スムーズに回転しているテザードセルにおいても、菌体とガラス面が接触している可能性は十分高いといえる。

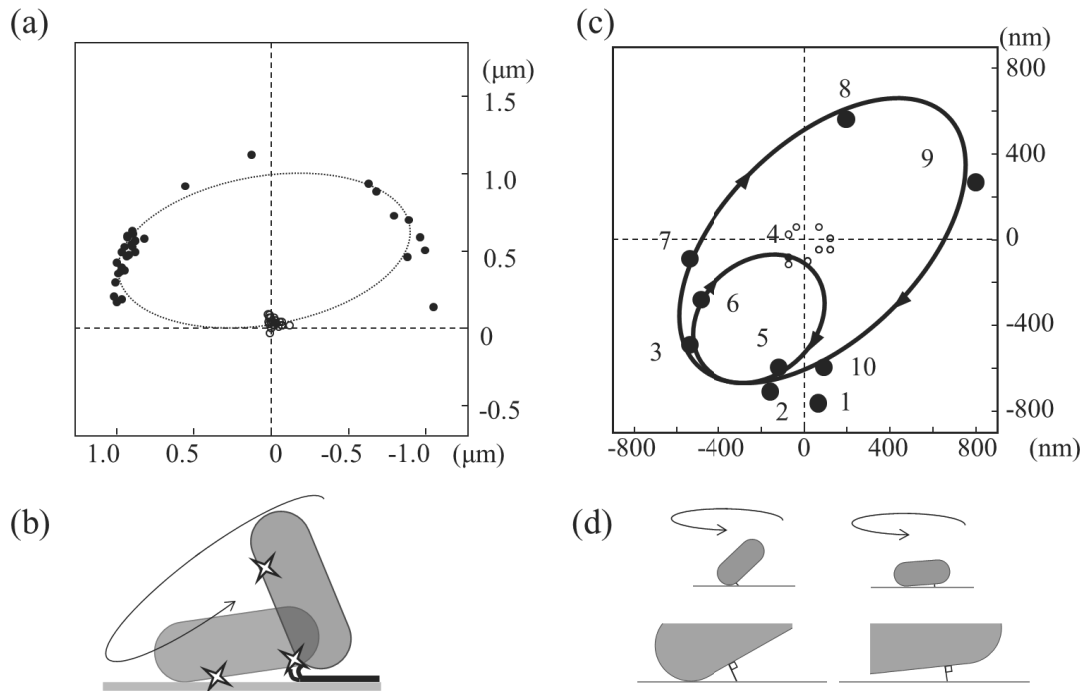


図 3-6 TH9541 (short hook mutant)によるテザードセル

(a) ○ : 回転中心付近のモーターの位置, ● : 中心から離れた位置にあるモーターの位置を表す。○と●が重なる部分は, 菌体が立ち上がり 2つのモーターを示す蛍光スポットが重なったことを表す (b)。●が密になっているタイミングで, ガラス面と菌体が接触していると予想される。

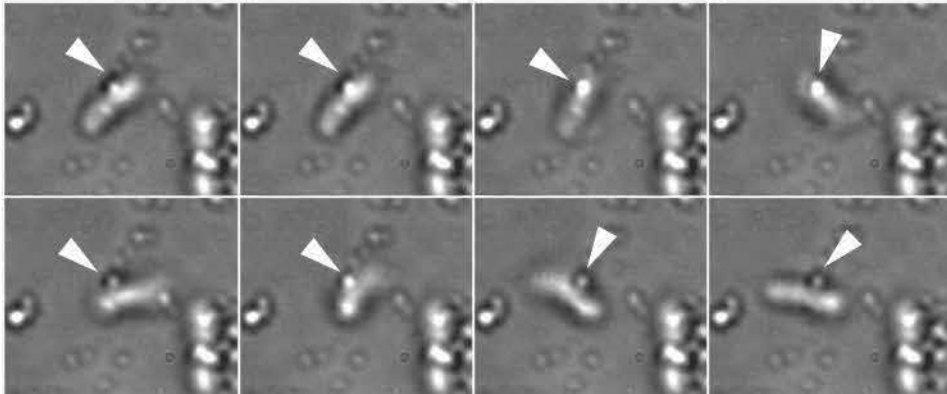
(c) ○ : 回転中心付近のモーターの位置, ● : 中心から離れた位置にあるモーターの位置を表す。●が2つの楕円軌道を描いていることから, 菌体が立ち上がったり, 倒れたりしながら旋回していることが予想される(d)。

##### (5) マイクロビーズ上でのテザードセルの回転の様子

ガラス面と菌体の距離を遠ざけた場合、テザードセルの回転はどのようになるのか。菌体とガラス面が接触しないように、スライドガラスに置いたマイクロビーズ上でテザードセルを作成し回転の様子を観察した。SJW1103 に pAH24 を導入した菌株を用いて、ガラス面に直接テザードセルを作らせたときと比較しながら、違いの原因を検討した。マイクロビーズは、直径 100 nm, 200 nm, 300 nm のものを用意し、それぞれに抗べん毛抗体を吸着させたものを用いた。直径 100 nm の場合、マイクロビーズが小さすぎて、顕微鏡下でマイクロビーズであるという区別をつけることが難しかった。200 nm と 300 nm の場合には、ビーズを十分認識することができた。どちらのビーズを使用しても結果に大きな差異はなかったため、200 nm のビーズを用いて実験を進めた。

ガラス面に直接テザードセルを作らせた場合よりも、マイクロビーズ上に作らせた場合の方が、視野中で確認できるテザードセルの数が2倍近くに増えた。しかし、回転の安定性を見ると、マイクロビーズ上にあるテザードセルのほぼすべてが、ガラス面上でのものと比較して異常な動きを見せた。例えば、図 3-7(a) は、2 つのテザードセルの様子を表したものである。上段のテザードセルでは、菌体が回転することで大きくピントがずれるタイミングがあることが分かる。これは、マイクロビーズ (矢印で示したドット) を中心に菌体が大きく上下に揺れながら旋回していることを表している。また下段のテザードセルでは、マイクロビーズの周りを菌体自体が旋回している様子が見られる。このように菌体が大きく揺れながら回転できるのは、菌体がガラス面から離れたことで自由に回転できるようになったためだと考えることができ、すなわち、通常ガラス面上で回転するテザードセルはガラス面との接触により回転自体にある程度の制約を受けているということができる。

(a)



(b)

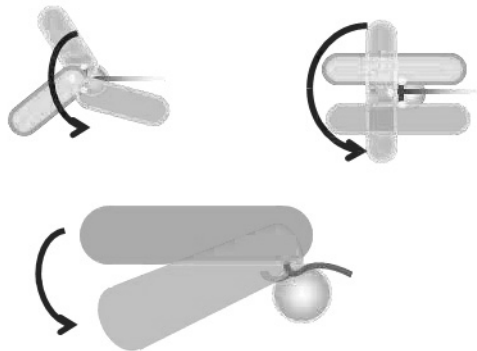


図 3-7 200 nm マイクロビーズ上で回転するテザードセル

(a) 白矢印で示したドットは、直径 200 nm のマイクロビーズであり、その他のドットはモーターに組み込まれた YFP の蛍光によるものである。上段と下段は別々の菌体が回転する様子を、27 mS おきに撮影したものである。

(b) 左上の図は (a) の上段の回転の様子の模式図、右上の図は (b) の回転の様子を模式図で表したものである。下図は、ビーズ上で回転する菌体のもつフックの様子を推測した図である。

## (6) 結果まとめ

テザードセルはこれまで考えられていたよりも回転はスムーズではなく、1点を中心に回転しているのではないことが分かった。また、固定されたべん毛につながるモーターは、蛍光の揺らぎによる測定誤差を考慮しても 50-200 nm 程度の直径で旋回していることが分かった。この旋回の原因はフックの柔軟性にあり、フックの長さが長くなれば旋回の揺れ幅も大きくなることが示された。また柔軟なフックでは、回転中の菌体を一定の角度で支え続けることは不可能であり、テザードセルはガラス面と接触しながら回転していることも示唆された。

これらの結果を踏まえて、テザードセルは定性的な実験には有効な手段ではあるが、定量的な実験には不向きであることが示された。



### 3-4 考察

テザードセルは、べん毛モーターが回転していることを直接的に証明した方法として長年その実験結果の有効性を疑うことはなかった。しかし本研究により、テザードセルを使用した過去の研究成果のうち、定量的な部分に関しては再度その数値を検証すべきであると言わざるを得ない。本研究で私は、これまで観察に適していないため無視されてきたスムーズに回転していないテザードセルの動きを分析することで、テザードセルの従来の考え方に疑問を持つに至った。

これまでフックの物性をほとんど検証することなく、フックは剛体であるという無意識の前提のもとにテザードセルはイメージされてきた。一方で、フックがべん毛モーターで発生したトルクや回転方向の切り替えをべん毛繊維に伝動するためには、フックに柔軟性が必要であることも理解されており、この矛盾する 2 つの考え方が平行して存在してもなお、テザードセルを定量的な実験 (回転速度の測定など) に利用することに研究者が強く反対することはほぼなかった。

直接フックの柔軟性を測定してはいないが、本研究においてフックが剛体である証拠はどこにも見られなかった。テザードセルは常にべん毛モーターの動きにより回転しながら、かつ旋回していたことから、フックは常に柔軟に曲がる方向を変えられると考えるのが妥当である。つまり、これまでテザードセルの回転運動から推測されたべん毛モーターの数値的な特徴は、べん毛モーターの回転のみを反映してものではないということになる。

YFP-FliN を組み込んだべん毛モーターを持つ菌株を用いてテザードセルを作成した場合、菌体を回転させるべん毛モーターの位置を示す蛍光スポットは、 $\sim 100$  nm の半径で旋回した。フックの長さはおおよそ 55 nm である。55 nm のフックで半径 100 nm の動きは実際に可能だろうか。Leake *et al.*, (2006) によると、テ

ザードセルを作成した場合、べん毛モーターの固定子である膜タンパク質 MotB は、ガラス表面から～90 nm 離れた位置にあることが分かっている。本研究で作成したテザードセルにおいて、ガラス表面に固定されたべん毛から YFP-FliN を含む C リングまでの間には、フック (約 55 nm)、ロッドやそれに付属するリング (約 30 nm) があり、C リングの大きさも考えると、ガラス面から YFP-FliN までの距離は 90 nm を超えると推定できる (Hirano *et al.*, 1994; Koroyasu *et al.*, 1998; Shibata *et al.*, 2007)。フック全体が大きく揺らいだ場合、半径 100 nm でべん毛モーターが回転することは可能である。

フックの柔軟性以外で、テザードセルが不安定な回転をする原因として、べん毛の固定が不十分である可能性も考えられる。しかし、この場合菌体はガラス面から大きく距離をとることが可能になり、テザードセルの回転中心付近の蛍光スポットの動きはもっと大きくなると予想される。また、50 nm 程度の半径で蛍光スポットが動く場合の説明も難しくなる。フックの長さや回転半径の大きさに相関関係があったことから、蛍光スポットの回転の主な原因はフックにあると結論付けることができる。

フックが柔軟に曲がることにより、テザードセルはガラス表面と接触しながら回転していることが示唆された。ガラス面上には抗べん毛抗体が吸着しており、実際には菌体は抗体の層に接触していると考えられる。どのくらい菌体と抗体の層とは離れているのだろうか。ガラス面に吸着した抗体の層の厚さを知るために、AFM (atomic force microscopy) で測定を依頼した。予備的な実験段階ではあるが、抗べん毛抗体の厚さはおよそ 30 nm であることがわかった。これに単離したべん毛繊維をのせると、べん毛の太さの 10%程度が抗べん毛抗体の層に沈み込んだ状態になった。つまり、菌体と抗体の層との間の距離は、ガラス面上に直接べん毛が固定されていると想定した場合よりも近くなることになる。

また、抗体の層の表面はガラス表面よりも凹凸があるので、菌体と抗体の層の接触の仕方によっては、テザードセルの動きはより複雑になる。

べん毛を構成するタンパク質の構造の決定は、タンパク質の自己集合性が高いため難しいとされてきた。したがって、電子顕微鏡による詳細な観察に加えて、部分的に決定された構造から全体像を予測したり、アミノ酸の相同性から似たようなタンパク質の構造を適応するなどの手法により、べん毛を構成する部品を重ねの仕方、性質を推測してきた。様々な手法や新たな技術が開発されている中で、古典的な手法で間接的に示されてきた提案の中には、再検証が必要なものも出てくるはずである。本研究は本来、テザードセルを使用してべん毛モーターのトルク発生の詳細を研究することを目的として始まったものである。その中で、新たな知見を得られたことにより研究の手法そのものに課題があることの発見に至った。べん毛モーターの回転やトルク発生の詳細な機構を知るためには、フックの影響と物性の理解が必要であり、フックの柔軟性を考慮した全体構造の解明が求められる。

## 参考文献

Berg, H. C., Anderson, R. M. (1973). Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*, 245, 380-382.

Berg, H. C., Manson, M. D., Conley, M. P. (1982). Dynamics and energetics of flagellar rotation in bacteria. *Symp. Soc. Expt. Biol.*, 35, 1-31.

Berg, H. C., Turner, L. (1993). Torque generated by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Biophys. J.*, 65, 2201-2216.

Berg, H. C., Turner, L. (1995). Cells of *Escherichia coli* swim either end forward. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 477-479.

Blair, D. F., Berg, H. C. (1988). Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science*, 242, 1678-1681.

Block, S. M., Berg, H. C. (1984). Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature*, 309, 470-472.

Block, S. M., Blair, D. F. & Berg, H. C. (1989). Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature*, 338, 514-518.

Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D., DeRosier, D. J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.*, 235, 1261-1270.

Fukuoka, H., Sowa, Y., Kojima, S., Ishijima, A., Homma, M. (2007). Visualization of functional rotor proteins of the bacterial flagellar motor in the cell membrane. *J. Mol. Biol.*, 367, 692-701.

Fung, D. C., Berg, H. C. (1995). Powering the flagellar motor of *Escherichia coli* with an external voltage source. *Nature*, 375, 809-812.

Hirano, T., Shibata, S., Ohnishi, K., Tani, T., Aizawa, S.-I. (2005). N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook. *Mol. Microbiol.*, 56, 346-360.

Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., Aizawa, S.-I. (1994). Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 176, 5439-5449.

Khan, I. H., Reese, T. S., Khan, S. (1992). The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 5956-5960.

Khan, S., Meister, M., Berg, H. C. (1985). Constraints on flagellar rotation. *J. Mol. Biol.*, 184, 645-656.

Koroyasu, S., Yamazato, M., Hirano, T. & Aizawa, S.-I. (1998). Kinetic analysis of the growth rate of the flagellar hook in *Salmonella typhimurium* by the population balance method. *Biophys. J.*, 74, 436-443.

Leake, M. C., Chandler, J. H., Wadhams, G. H., Bai, F., Berry, R. M., Armitage, J. P. (2006). Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature*, 443, 355-358.

Macnab, R. M. (1996). Flagella and motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. pp. 123 - 145, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Meister, M., Berg, H. C. (1987). The stall torque of the bacterial flagellar motor. *Biophys. J.*, 52, 413-419.

Meister, M., Lowe, G., Berg, H. C. (1987). The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell*, 49, 643-650.

Ohnishi, K., Fan, F., Schoenhals, G. J., Kihara, M., Macnab, R. M. (1997). The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J. Bacteriol.*, 179, 6092-6099.

Ryu, W. S., Berry, R. M., Berg, H. C. (2000). Torque generating units of the flagellar motor of *Escherichia coli* have a high duty ratio. *Nature*, 403, 444-447.

Samuel, A. D., Berg, H. C. (1995). Fluctuation analysis of rotational speeds of the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 3502-3506.

Samuel, A. D., Berg, H. C. (1996). Torque-generating units of the bacterial flagellar motor step independently. *Biophys. J.*, 71, 918-923.

Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F. F. V., Karlinsey, J. E., Hughes, K. T. & Aizawa, S.-I. (2007). FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol. Microbiol.*, 64, 1404-1415.

Shimada, K., Berg, H. C. (1987). Response of the flagellar rotary motor to abrupt changes in extracellular pH. *J. Mol. Biol.*, 193, 585-589.

Silverman, M., Simon, M. I. (1974). Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature*, 249, 73-74.

Turner, L., Caplan, S. R. & Berg, H. C. (1996). Temperature-induced switching of the bacterial flagellar motor. *Biophys. J.*, 71, 2227-2233.

Yamaguchi, S., Aizawa, S.-I., Kihara, M., Isomura, M., Jones, C. J., Macnab, R. M. (1986). Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 168, 1172-1179.

Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S.-I., Macnab, R. M. (1986). Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching. *J. Bacteriol.*, 166, 187-193.



## 第4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

### 4-1 導入

タンパク質は一般的には、それぞれ特定の立体構造をとり、それにより固有の機能を発揮すると考えられている。一方で、X線結晶構造解析やNMR、バイオインフォマティクスによるアミノ酸配列の解析などにより、多くのタンパク質はその分子内に明確な三次元構造を持たず (disorder), むしろダイナミックに変換する領域があることも分かっており天然変性領域 (IDR) と呼ばれている (Dyson, 2011; Uversky *et al.*, 2010, 2012)。このような領域は、真核生物の核内で遺伝子発現調節に関わるタンパク質に偏在しており、きわめて重要な働きをしている (Dyson *et al.*, 2005; Garza *et al.*, 2009; Uversky *et al.*, 2008, 2009; Vuzman *et al.*, 2012)。IDR は固く折りたたまれたサブユニットやドメインに結合すると、それ自身も折りたたまれて (order) 構造を持ち、機能を発揮するようになることが知られている (Sugase *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2009)。しかし、すべての IDR が disorder と order の間で相互変換しているわけではない。相互作用により明確な構造をとるようになるのではなく、動的な複合体を形成する場合もある (Fuxreiter, 2012; Mittag *et al.*, 2010)。また、IDR が関わる相互作用は、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化といった翻訳後修飾によって調節を受けるといわれている (Vuzman *et al.*, 2008; Fuxreiter, 2012; Iakoucheva *et al.*, 2004)。

*Drosophila* の転写促進タンパク質複合体である FACT (dFACT) にある IDR と構造を持つドメイン (rigid ドメイン) の挙動は、high-speed atomic force (HS-AFM) により可視化することができている (Miyagi *et al.*, 2008)。FACT はクロマチンリモデリング因子に分類され、SSRP1 と SPT16 サブユニットからなるヘテロダイマー複合体である (図 4-1)。どちらのサブユニットもいくつかの IDR と rigid ドメ

インをもち、これらがクロマチンのリモデリングに関与している (Formosa, 2012; Nakayama *et al.*, 2007; Reinberg *et al.*, 2006; Shimojima *et al.*, 2003; Winkler *et al.*, 2011)。dFACT とヌクレオソームの相互作用に関する以前の研究で、dFACT は dSSRP1 にある rigid ドメインである HMG と、それに隣接する塩基性の IDR である BID を介して、ヌクレオソームの DNA に結合することが示されている (図 4-1, Tsunaka *et al.*, 2009)。また、BID に隣接する酸性の IDR (AID) は HMG と BID に分子内相互作用をすることができるが、AID が広範囲にリン酸化されると、その領域の負電荷が増えることで相互作用が強くなることも示されている (Tsunaka *et al.*, 2009)。その結果、dFACT のヌクレオソーム DNA への結合がブロックされ、rigid な構造への変換が阻害されると考えられる。生体内でこのようなリン酸化を利用した機構は、例えば、胚の初期発生において重要な働きをすることが予想される。受精直後、母由来の SSRP1 が脱リン酸化されることでヌクレオソームとの結合が可能になり、初期発生に必要な遺伝子の転写を速やかに開始することができるようになるのである。ヒトの場合、SSRP1 の脱リン酸化はヌクレオソームとの高い親和性を示すためには不可欠な現象であるが、酵母の場合は Nhp6a/b タンパク質が DNA との相互作用を担っており、リン酸化依存的な調節は、高等真核生物においてのみで見られる機構である可能性が高い (Formosa *et al.*, 2012; Brewster *et al.*, 2001; Xin *et al.*, 2009)。このように、AID のリン酸化の重要性は認知されているが、どうやって HMG とヌクレオソーム DNA の結合をブロックするのか、原子レベルでのメカニズムは明らかになっていない。

本研究では、AID と DNA 結合領域 (BID-HMG) の分子内相互作用のメカニズムを明らかにするために、リン酸化の影響を NMR スペクトルの比較から解析した。また、共同研究を行った金沢大学・古寺哲幸教授らによる HS-AFM に

よる解析と合わせ (参考論文③), リン酸化の効果について考察した。その結果, AID 内の複数のリン酸化は AID と DNA 結合領域との静電的な相互作用を強化すること, 相互作用により形成される構造は動的であり, 遷移することを示した。

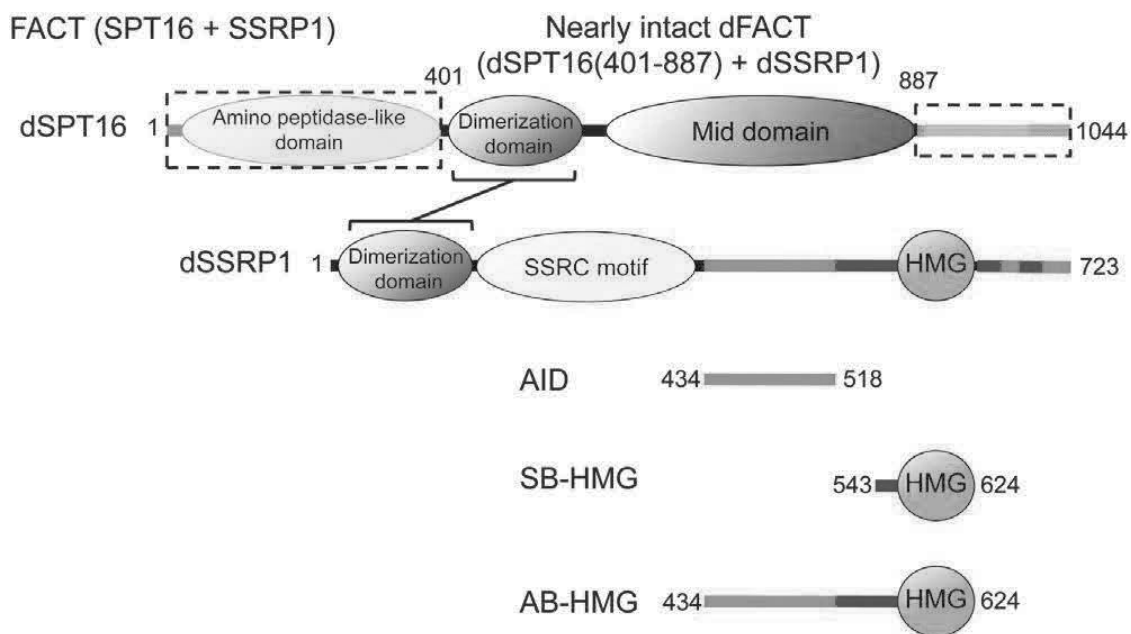


図 4-1 dFACT を構成する SPT1 と SSRP1 の模式図

FACT は SPT16 と SSRP1 によるヘテロダイマーである。本研究で NMR 測定に用いたサンプルは、SSRP1 にある AID, SB-HMG, AB-HMG をそれぞれ発現するプラスミドを作成し、大腸菌による大量発現系を用いて単離・精製した。図中の数字は、アミノ酸番号を表す。

HS-AFM には、dSPT16 (401-887) と dSSRP1 の全長からなるヘテロダイマーを試料として用いた。

## 4-2 方法

### (1) AID, SB-HGM, AB-HMG 断片の精製

SSRP1 の断片である AID, SB-HGM, AB-HMG については, 図 4-1 にそのアミノ酸配列の範囲を示している。それぞれの cDNA は pET28a (Novagen) にクローニングし, *E.coli* strain BL21 (DE3) に導入し, 発現した断片は以下の方法で精製した。

それぞれの菌株は, 窒素源として 0.05% (w/v) の塩化アンモニウム, 炭素源として 0.4% もしくは 0.2% (w/v) の D-グルコースを含む M9 培地中で振とう培養した。OD<sub>600</sub>=0.6 に達した時点で, IPTG を終濃度 0.5 mM になるように添加した。SSRP1 の断片を同位体で標識する場合には, 窒素源を <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, 炭素源を <sup>13</sup>C でラベルした D-グルコースを用いた。OD<sub>600</sub> = 1.0 を越えるまで培養を続けた菌体を回収し, 50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) で再懸濁し, 氷上で超音波破碎した。pET28a にクローニングして発現した断片には His-tag が付加されており, 破碎後の上澄みから HiTrap FF column (GE healthcare) を使用して目的の断片を単離した。次に単離した断片を含む溶液に thrombin を添加して 4°C で 16 時間反応させ, His-tag を切断した。その後, AID と AB-HMG は HiTrap Q HP column (GE healthcare), SB-HMG は HiTrap Heparin HP column (GE Healthcare) に吸着させた。HPLC (Biologic DUOFLOW, Bio-Rad) を使い, 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 中の NaCl 濃度を 0~1 M に連続的に変化させながら column 内の分子を溶出し, 目的断片を含む画分を回収した。回収した溶液は, 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH6.6) を外液に透析し, NaCl を除去した。さらに Amicon Ultra 3K (Millipore) を使って濃縮した。このようにして精製した AID は精製後に比較的容易に分解されることがわかったので, 濃縮後の溶液を 95°C で 5 分間加熱して残留するプロテアーゼを不活性化し, AID が分解されることを防いだ。NMR による <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの測定により, 加熱前後

で AID のスペクトルに変化がなかったため、加熱処理が AID の分子的性質に影響を与えることはないことが確認できた。

## (2) Casein kinase 2 (CK2) による AID および AB-HMG のリン酸化

加熱処理した AID 断片 (終濃度 0.05 mM) を、500  $\mu$ L の反応液 (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP) 中で 250 U の CK2 (New England Biolabs) によりリン酸化した。30°C で 40 時間反応後、反応液を 50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH6.6) で透析し、Zeba Desalt Spin Column (ThermoFisher) を使って残留した ATP を除去した。リン酸化が成功したかどうかは、SDS-PAGE と MALDI-TOFF MASS (AXIMA-CFR plus, SHIMAZU) で分子量を測定することで確認した。

AID と CK2 を反応させた溶液を SDS-PAGE により泳動・分離後、リン酸化タンパク質と反応する Pro-Q Diamond (Invitrogen) で染色した。また、AID 上には CK2 によりリン酸化される Ser が 9 か所、Thr が 1 か所あり、アミノ酸が 1 か所リン酸化を受けると分子量は 80 程度大きくなる。分子量の増加分から、CK2 により Ser/Thr が何か所リン酸化されたかを確認したサンプルを用いて NMR スペクトルの測定を行った。同位体で標識したリン酸化 AID (pAID) と非リン酸化 AID の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを比較したところ、Ser/Thr のスペクトルの位置が変化していることが確認できた。

AB-HMG も同様に CK2 によってリン酸化し、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを測定した。AB-HMG の場合は反応時間 16 時間で十分なリン酸化が進んだ。リン酸化された AB-HMG (pAB-HMG) は、緩衝液に対する可溶性が著しく低下した。おそらくリン酸化の影響で分子内もしくは分子間相互作用が強くなったためであると考えられるが、これが原因で NMR シグナルの帰属ができなかった。

### (3) NMRスペクトルの測定

$^{15}\text{N}$ もしくは $^{13}\text{C}$ と $^{15}\text{N}$ によって標識したAIDとSB-HMGは、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH6.6)で濃度を調整し、HNCO, HNCA, HN(CA)CO, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HNCACB, HN(CA)NNHを測定した。これにより AID, pAID, SB-HMGの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCのスペクトルをそれぞれ帰属した。すべての実験はDMX600を用いて共振周波数600 MHzで測定し、測定温度は、SB-HMGは293K, AIDは303Kである。測定データはRoland NMR toolkitで処理し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルはNMRPipeを用いて変換・解析した。主鎖の帰属にはSPARKYを用いた。

Heteronuclear  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  nuclear Overhauser effect (NOE)の測定は、DMX600を用いて測定温度303 Kで行った (参考論文③ Supporting Material)。NOEによるピーク強度の増減から、空間的に近い位置にある $^1\text{H}$ と $^{15}\text{N}$ の組み合わせを調べた。これにより、AIDのリン酸化が構造に与える影響を見積もった。

### (4) NMRを用いた、AIDとSB-HMGの滴定実験

AIDとSB-HMGの滴定実験には2つの方法を用いた。AIDを $^{15}\text{N}$ で標識した場合とSB-HMGを $^{15}\text{N}$ で標識した場合である。標識したSB-HMGに対して非標識のAIDを滴定する場合、SB-HMGは0.3 mMに、AIDは1.3 mMに事前に調整した。実験は293Kで行い、SB-HMGに対してAIDを添加しながら測定した。添加量は、両者の濃度比が、 $[\text{AID}]/[\text{SB-HMG}]=0.0, 0.1, 0.3, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0$ になるように計算して調節した。pAIDを滴定した場合は、濃度比が、 $[\text{pAID}]/[\text{SB-HMG}]=0.0, 0.1, 0.3, 0.7, 1.0, 1.5$ になるように調整した。 $^{15}\text{N}$ で標識したAID (0.3 mM), pAID (0.3 mM)を非標識のSB-HMG (1.0 mM)で滴定した場合は、濃度比はそれぞれ、 $[\text{SB-HMG}]/[\text{AID}]=0.0, 0.1, 0.3, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0$ と、 $[\text{SB-HMG}]/[\text{pAID}]=0.0, 0.3, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0$ になるように調節し、測

定温度303 Kで実験を行った。滴定曲線は以下の方法により分析し、各アミノ酸の $K_D$ の値を求めた (Yasuno et al., 2001)。

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{\text{sat}}}{2[P]_t} \{ (K_D + [P]_t + n[A]_t) - ((K_D + [P]_t + n[A]_t)^2 - 4n[P]_t[A]_t)^{1/2} \}$$

$\Delta\delta$ は滴定前後での化学シフトの差であり、 $^1\text{H}$ の $\Delta\delta$ と $^{15}\text{N}$ の $\Delta\delta$ の値から

$$\Delta\delta = \sqrt{\Delta\delta(^1\text{H})^2 + (\Delta\delta(^{15}\text{N})/5)^2}$$

により求められる。 $\Delta\delta_{\text{sat}}$ は滴定曲線が頭打ちになった時の化学シフトの変化量であり、 $[P]_t$ は滴定されたタンパク質の濃度、 $[A]_t$ は滴定したタンパク質の濃度を表す。 $n$ は滴定したタンパク質にある結合サイトの数である。 $K_D$ はタンパク質同士の解離定数である。

$^{15}\text{N}$ でラベルしたSB-HMGとAIDもしくはpAIDとの滴定実験の結果から $K_D$ と $n$ の値を決定するために、グローバルフィッティングによる分析を行った。計算には、化学シフトの変化量が平均よりも大きいアミノ酸の滴定曲線を使用した。AIDの場合は11個のアミノ酸、pAIDの場合には30個のアミノ酸の滴定曲線のデータを使い、モンテカルロ法を用いて測定誤差を求めた。

$^{15}\text{N}$ でラベルしたAIDとSB-HMGの滴定実験の結果から $K_D$ と $n$ の値を決定するために、 $n$ の値を固定した状態で $K_D$ をもとめた。個々のアミノ酸についてもとめた $K_D$ の値から、分析したアミノ酸残基を親和性の高いもの ( $K_D$ が $10^{-6}$  M)と低いもの ( $K_D$ が $10^{-5}$  M)とに分類することができた。

## (5) NMRによるAB-HMGと二本鎖DNA (dsDNA)の相互作用の分析

$^{15}\text{N}$ でラベルしたAB-HMGとpAB-HMGにdsDNAを作用させたときのNMRスペクトルの変化を分析した。AB-HMGの溶解度が低く、スペクトル同士の重なりも多くあったことから、AB-HMGの主鎖のスペクトルを完全に帰属することはできなかった。dsDNA (5'-d(CGCGATATCGCG)<sub>2</sub>-3')と添加して反応させたAB-



HMGもしくはpAB-HMGは、NAP-10 columnを使って溶媒を50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 6.6)に置換し、NMRスペクトルの測定に用いた。

### 4-3 結果

#### (1) AIDのリン酸化とリン酸化AIDの構造にみられる特徴

本研究に用いた各種SSRP1断片は、図4-1に模式的に表している。図4-2はAB-HMG断片のアミノ酸配列を示し、赤でマークしたSer / Thrがリン酸化を受けると考えられるアミノ酸である。CK2を反応させたAIDは、Pro-Q Diamondにより染色されたことから、リン酸化を受けていることが確認できた (図4-3)。AID断片にあるリン酸化サイトのうち、どこが、どれだけリン酸化されたかは不明であった。そこで、反応時間ごとにサンプリングした試料の分子量をMALDI-TOFF MASSでそれぞれ測定し、リン酸化サイトのうち何か所がリン酸化されるのかを確認した。30°Cで16時間反応させたときには、反応前のAIDよりも分子量が490増加したピークと570増加したピークが大きく表れた (図4-4 (a))。リン酸基の分子量がおよそ80であるとする、それぞれ、6か所・7か所のSer / Thrがリン酸化されたことになる。反応開始から24時間後、40時間後の試料についても同様に分子量を測定したところ、40時間後に+810, +890のピークが現れることが確認できた。つまり、30°Cで40時間反応させることでAID断片を10もしくは11か所リン酸化できることが分かった。同様にして、AB-HMGについてもリン酸化を行い、MALDI-TOFF MASSで分子量を測定したところ、こちらは16時間程度でリン酸化が完結することが確かめられた(図4-4 (b))。ただし、AB-HMGではリン酸化の程度が低いサンプルも残っていた。この原因は、AB-HMGがリン酸化を受けることで分子内相互作用を起こし、それが原因でCK2との反応効率が低下するためではないかと推測される。

次にAIDとpAIDについて、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの測定と帰属を行った。図4-5にあるように、AIDの測定結果は構造を持たないタンパク質で見られる典型的なスペクトルを表した。pAIDの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを測定したところ、

Serを中心にスペクトルが大きく変異していることが分かった。一方でT477のスペクトルはほとんど変化しておらず、リン酸化を受けていない可能性を示した。CK2はThrに対して活性が低く、そのためリン酸化があまり進まなかったと考えられる (Sarno *et al.*, 1996)。またAIDはリン酸化を受けても、各アミノ酸のスペクトルの位置が $^{15}\text{N}$ 軸方向に分散することはなかった。これは、リン酸化の影響でAIDが立体的な構造を持つことはないということを示している。

AIDのheteronuclear  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  NOEの測定結果を図4-6にグラフ化した。ほとんどのアミノ酸残基の差NOEは負の値を示したことから、AID断片は基本的に構造を持たない状態であることが分かる。453番目のアミノ酸周辺ではNOEが正の値をとった。この領域は親水性のアミノ酸の割合が高く、そのためこの部分だけ主鎖の動きが制約されるためと考えられる。pAIDについてもAIDと同じような値を示し、こちらも構造を持っていなかった。heteronuclear NOEの値はpAIDの方が大きくなっており、これはおそらくリン酸基間の静電的な反発によりpAID断片の剛性が多少増加したためと考えられる。

residues No.		434	438	443	448	453	458		
	<u>G S H M</u>	G Y K D V D F G D	S	D N E N E P D A Y L A R L K A					
residues No.		463	468	473	478	483	488		
	E A R E K E E D D D D G D	S	D E E	S T	D E D F K P N E N E	S			
residues No.		493	498	503	508	513	518		
	D V A E E Y D	S	N V E	S D S	D D D	S	D A S G G G G D	S	D G A
residues No.		523	528	533	538	543	548		
	K K K K E K K	S	E K K E K K E K K H K E K E R T K K P S K K						
residues No.		553	558	563	568	573	578		
	K K D S G K P K R A T T A F M L W L N D T R E S I K R E N P								
residues No.		583	588	593	598	603	608		
	G I K V T E I A K K G G E M W K E L K D K S K W E D A A A K								
residues No.		613	618	623					
	D K Q R Y H D E M R N Y K P E A								

図4-2 AB-HMGのアミノ酸配列

AID：赤色の下線でマークした配列。(residues 434-518)

BID：紫色の下線でマークした配列。(residues 519-554)

HMG：青色の下線でマークした配列。(residues 555-624)

CK2リン酸化サイト：赤色のboxで囲んだアミノ酸

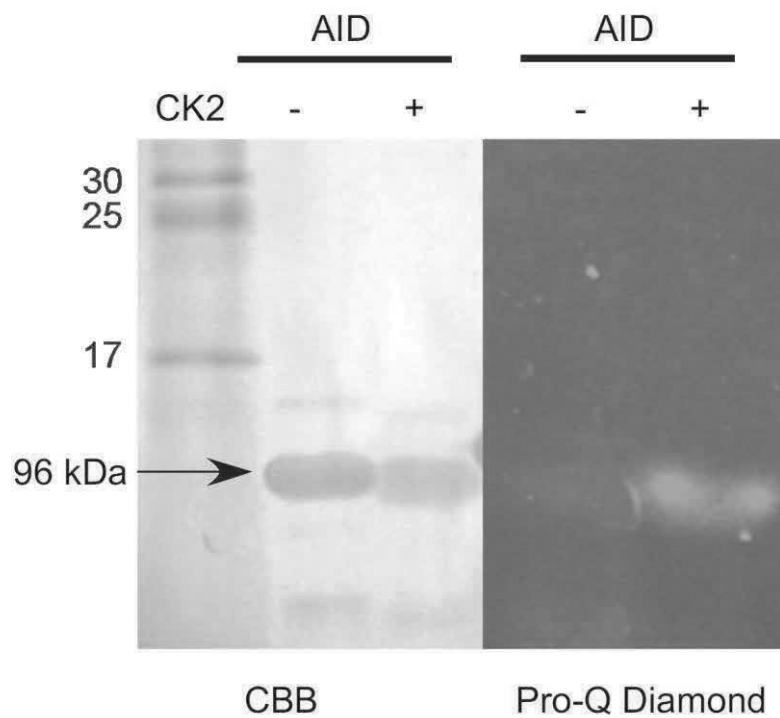
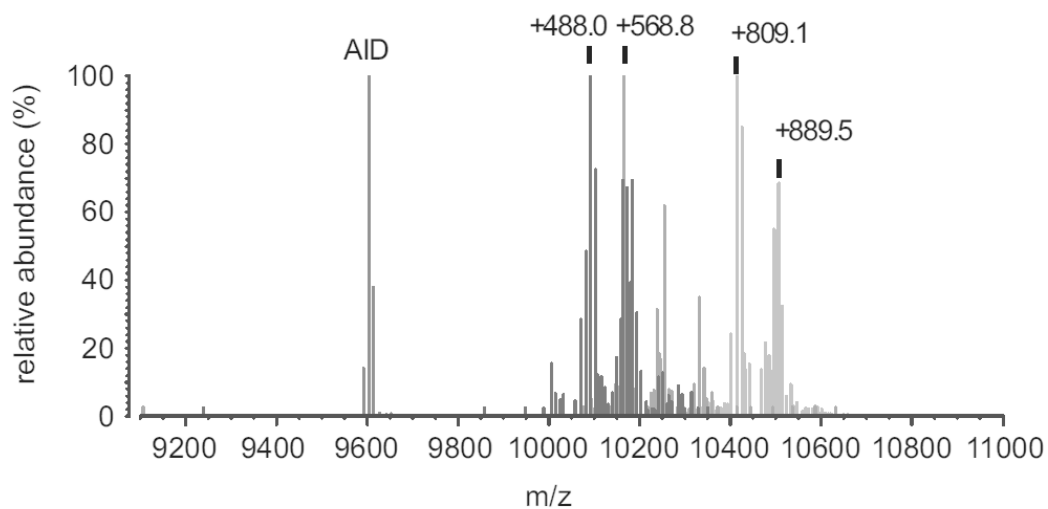


図4-3 AIDのリン酸化の確認

CK2でAIDを処理した。30°Cで40時間反応させた後、SDS-PAGEにより反応液中のAIDが分解されずに残っていることを確認した。その後、ゲルをPro-Q Dyamondで染色したところ (右)、CK2で処理したAID方だけが染色され、リン酸化が進んだことが確認できた。

(a) AID



(b) AB-HMG

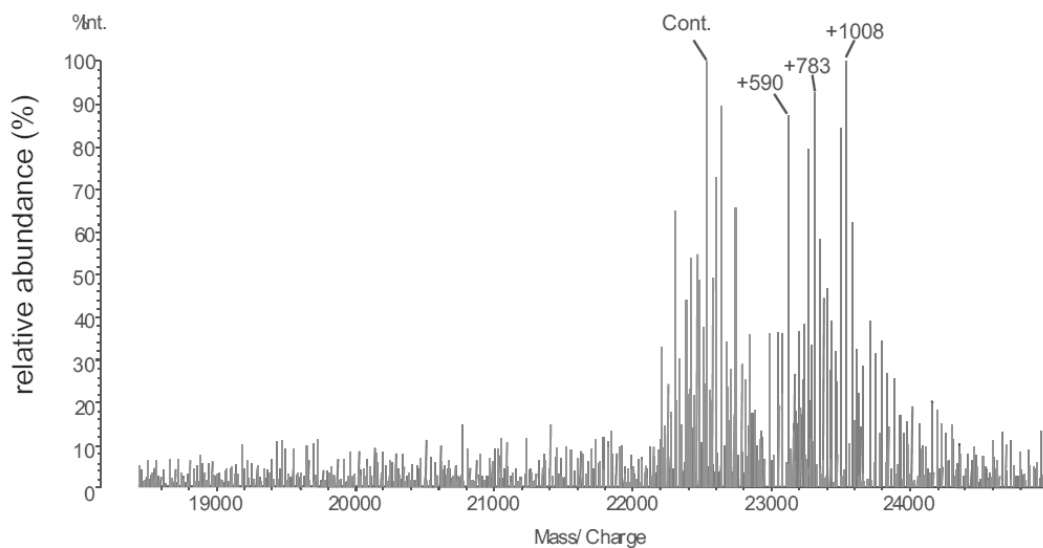


図4-4 MALDI-TOFF MASSによる分子量の測定

(a) AIDをCK2で処理したサンプルの測定結果。反応時間ごとサンプリングして分

子量を測定した。赤：未処理，青：16時間後，緑：24時間後，黄：40時間後

(b) AB-HMGをCK2で処理したサンプルの測定結果。赤：未処理，青：16時間後

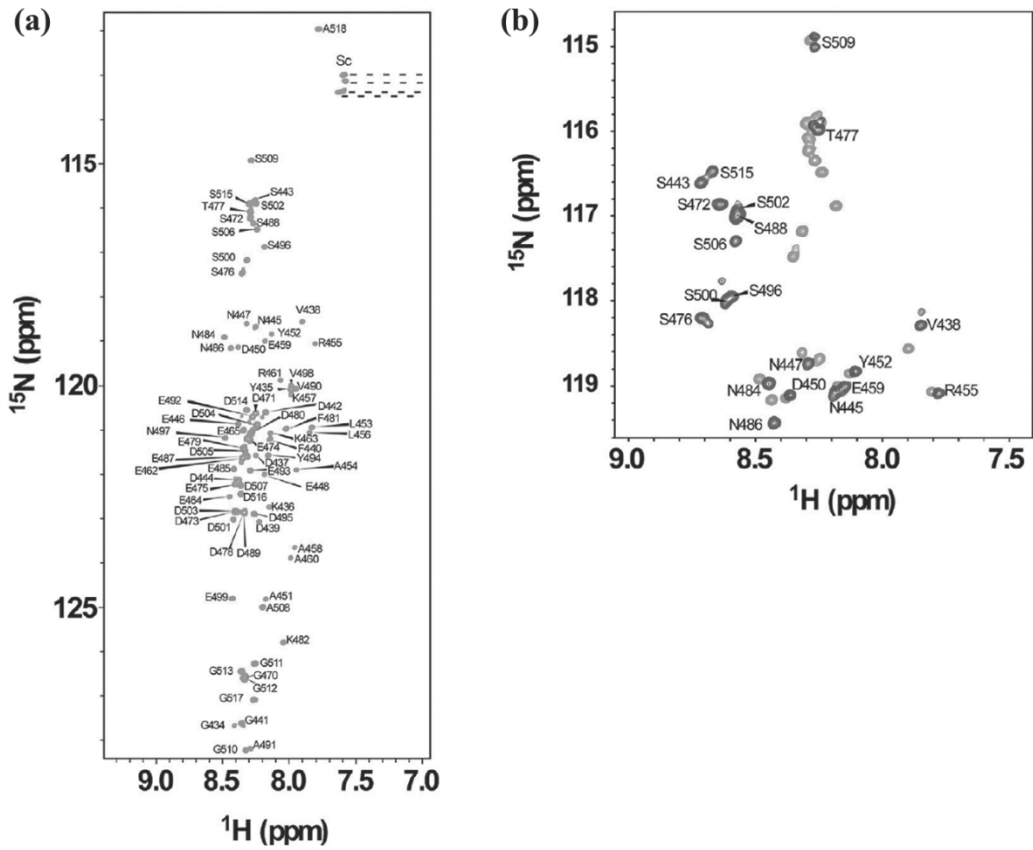


図4-5  $^{15}\text{N}$ 標識したAIDとpAIDのHSQCスペクトル

(a) AIDの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトル。

(b) AIDとpAIDの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの比較。赤 : AID, 青 : pAID

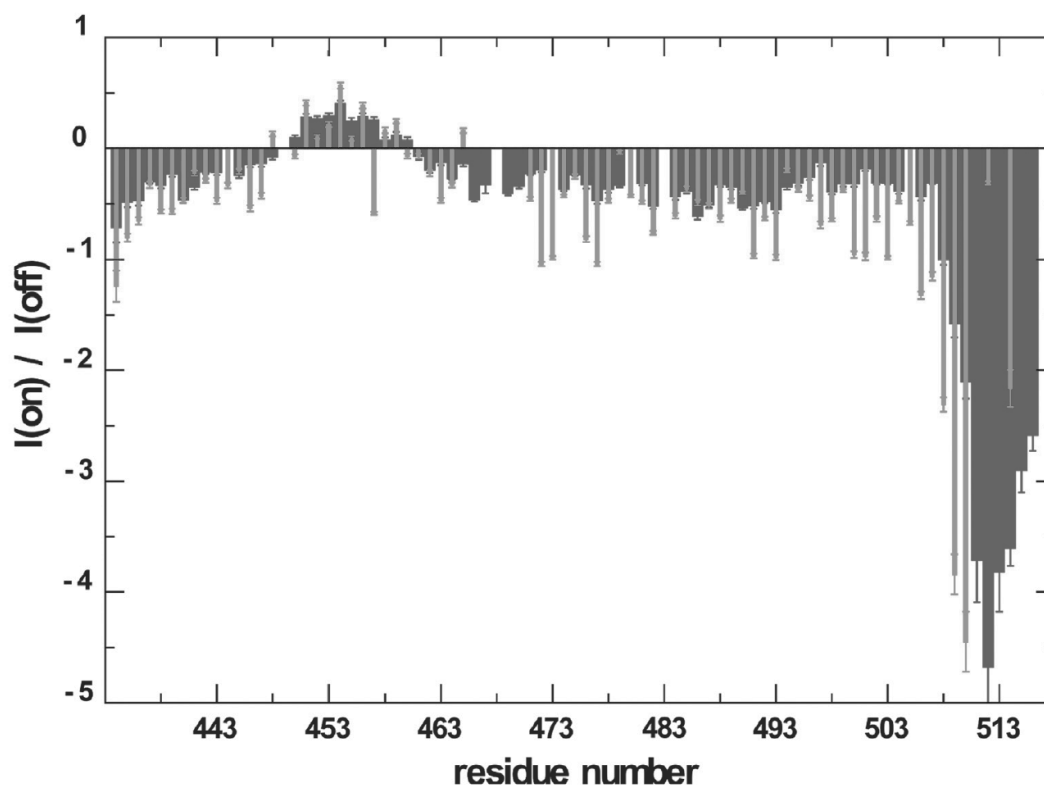


図4-6  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  heteronuclear NOE profile

赤 : AIDの差NOE, 青 : pAIDの差NOE



## (2) AID断片とSB-HMG断片間の相互作用について

分離した状態での2つの断片間の相互作用について、その結合様式を解明するために、 $^{15}\text{N}$ でラベルしたSB-HMGとAIDもしくはpAIDの組み合わせで滴定実験を行った (図4-7 (a)-(b))。 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの化学シフトの変位の様子を比較すると、AIDとpAIDがリン酸基の有無に関わらず、SB-HMG上の同じ結合サイトに対して相互作用することが分かった。どちらもHMG表面にあるDNA結合領域に作用したが、AIDの方がHMGよりも滴定による化学シフトの変化量が大きかったことから、主にはAIDの部分に結合すると考えられる(図4-7 (c)-(d))。これは、AIDがAIDとの分子内相互作用に必要であるという以前の報告に矛盾しない。pAIDを滴定した場合の化学シフト変化の大きさは、AIDを滴定した場合よりも全体的に大きくなった。これはpAIDの方がAIDよりもSB-HMGに対する親和性が高いことを示唆している。

AIDまたはpAIDとSB-HMGのモル比に対する化学シフトの変化をグラフ上にプロットし、カーブフィッティングを行ったところ、リン酸化によりSB-HMGへの結合様式が変化することが分かった (図4-7(e)-(f))。解離定数 ( $K_D$ )とSB-HMG上のAIDあるいはpAIDの結合サイトの数 ( $n$ ) を求めるために、化学シフトの変化量が平均以上を示したアミノ酸残基を対象に計算を行った。AIDを滴定した場合には11残基、pAIDの場合は30残基が対象となった。その結果、AID上のSB-HMG結合サイトの数は  $n = 2.0 \pm 0.1$  となり、 $K_D = 9.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ と推定された。また、AID上の結合サイトはどれも、SB-HMGに対して同等の親和性を持つことが分かった。pAIDの場合、SB-HMG結合サイトの数は  $n = 3.9 \pm 0.1$  となり、 $K_D = 1.01 \pm 0.02 \mu\text{M}$ と推定された。これは、リン酸化によりAID上の結合サイトが2倍に増えたことを示しており、これが親和性を強めたことを示唆している。これに関しては、SB-HMGとAIDもしくはpAIDについて等温滴定カロリーメトリー (ITC)

による分子間相互作用の分析を行った結果、pAIDの方がAIDと比較して結合サイトが2倍に増えることが確認できている (data not shown)。

$^{15}\text{N}$ でラベルしたAIDとpAIDについても、SB-HMGとの滴定実験を行った。 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQCスペクトルの化学シフトの変化の様子は図4-8にある通りである。AIDにある20のアミノ酸残基の化学シフトが、SB-HMGとの結合により有意に変化した (図4-8(e))。これらは、SB-HMGとの結合サイトにあたる部分だと考えられ、それぞれの $K_D$ を求めた結果、親和性の高い残基と低い残基に分類できることが分かった (図4-8(c))。グラフよりAID上にSB-HMGが物質質量比1:1で結合することが分かり、9か所の高親和性残基 ( $K_D=3.7\pm 0.1\ \mu\text{M}$ )、11か所の低親和性残基 ( $K_D=43\pm 1\ \mu\text{M}$ ) が確認できた。また、SB-HMGとの結合によるNMRのスペクトルの動きをみると、変化したすべてのスペクトルが直線的に移動していた (図4-8(a))。異なる親和性を持つ残基が別々に結合部位を形成する場合、化学シフト変化の軌跡は非一方向に移動するはずなので、これら残基の形成するSB-HMG結合サイトは個々に独立したものではないことが分かる。つまり、AID上にあるSB-HMG結合領域は、高親和性残基と低親和性残基のどちらもが含まれている可能性が考えられる。実際に、 $^{15}\text{N}$ でラベルされたSB-HMGとAIDの解離定数は ( $K_D=9.7\pm 0.3\ \mu\text{M}$ ) は、AID上にある高親和性残基の解離定数 ( $K_D=3.7\pm 0.1\ \mu\text{M}$ ) よりもやや大きい。おそらく、AID上の高親和性残基と低親和性残基がSB-HMGに別々に作用するのではなく、動的平衡状態で複数の複合体 (動的複合体) を形成するのではないかと予想される。

$^{15}\text{N}$ でラベルされたpAIDに対する滴定実験のグラフから、pAIDにはSB-HMGが最大4つまで結合できることがわかる (図4-8(d))。前述の実験で、pAID上にはSB-HMG結合サイトが4か所あると見積もられていたため、この結果と矛盾しないデータが得られた。pAIDのいくつかの残基は、SB-HMGの滴定において非一

方向にスペクトルが変化した (図4-8 (b))。これらの残基は、リン酸化されたセリンや酸性のアミノ酸残基が多く含まれるC末端側に局在していた (図4-8 (f))。似たようなスペクトルの変化は、複数のリガンドが結合するタンパク質においてみられることから、pAIDにあるリン酸化セリンが並ぶ領域にも、複数のSB-HMGが結合したと考えられる。

ここまでの結果を合わせると、AID上には最大2つのSB-HMGを結合することができるだけの大きさの結合領域があり、リン酸化によりこの領域が2倍に広がると想定できる。つまり、dSSRP1においては、リン酸化によりAID上にあるSB-HMGの結合領域が広がることで、分子内相互作用が起こる確率が上昇すると考えることができる。

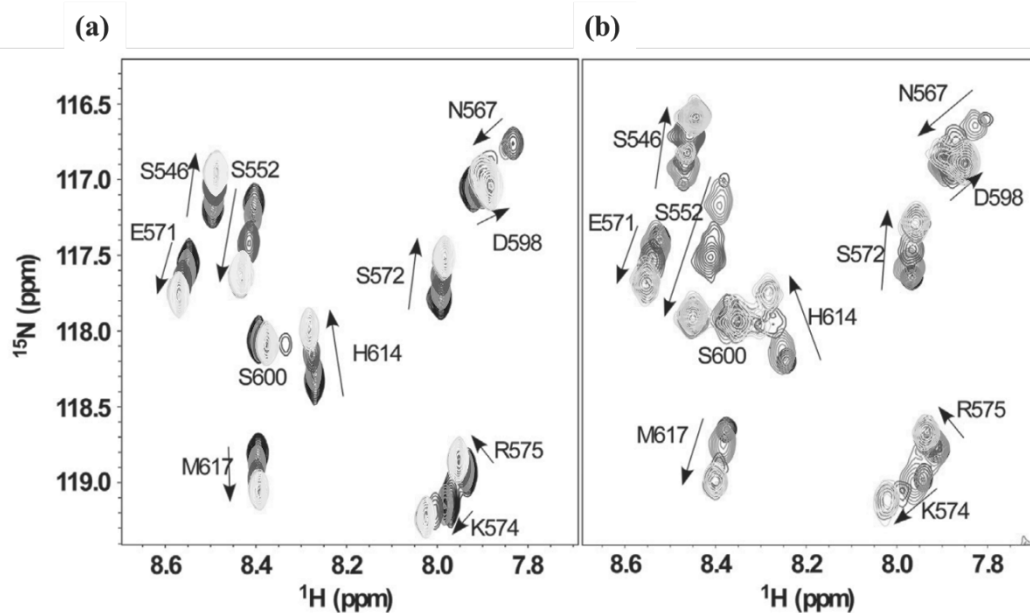


図4-7 (a) (b)  $^{15}\text{N}$ ラベルしたSB-HMGに対する滴定実験

(a) AIDを滴定したときの化学シフト変化

[AID]/[SB-HMG]=0.0(黒), 0.3(赤), 0.7(青), 1.0(オレンジ), 1.5(マゼンタ),  
2.0(緑), 3.0(黄)

(b) pAIDを滴定したときの化学シフト変化

[pAID]/[SB-HMG]=0.00(黒), 0.07(赤), 0.21(青), 0.49(オレンジ), 0.70(マ  
ゼンタ), 1.04(緑)

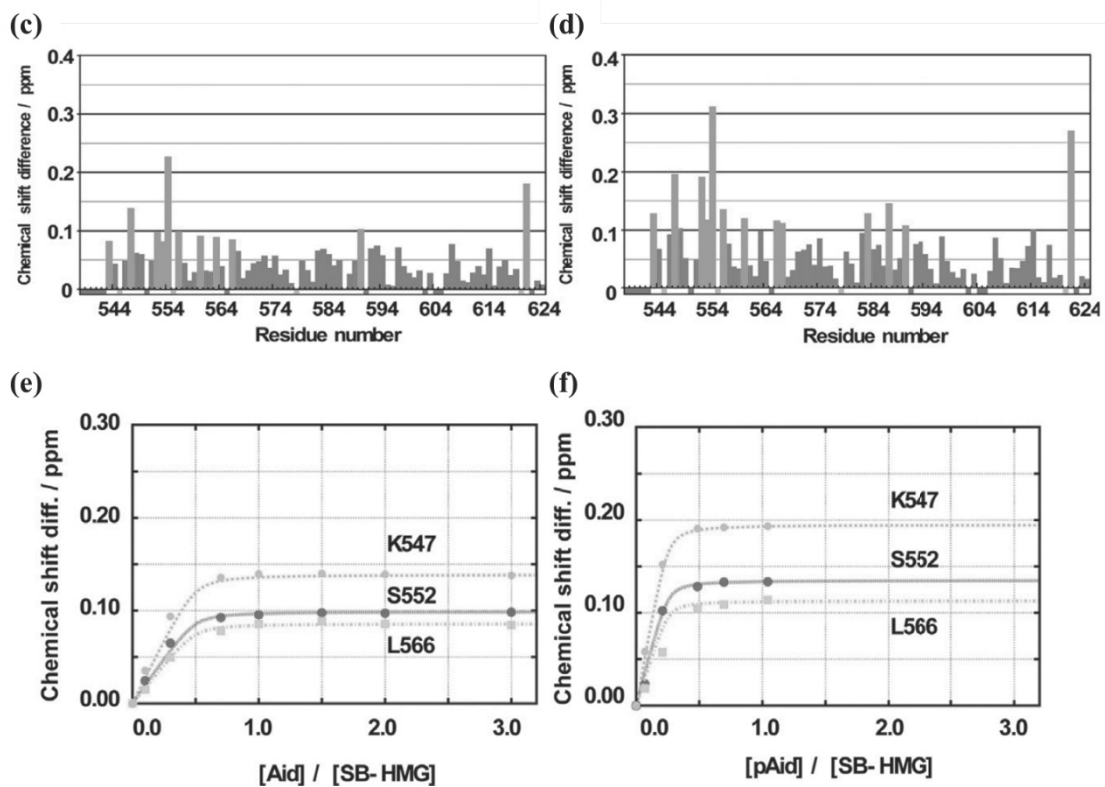


図4-7 (c) (f)  $^{15}\text{N}$ ラベルしたSB-HMGに対する滴定実験の解析

(c) – (d) AID (c)・pAID (d)を滴定したときのSB-HMGの化学シフトの変化。滴定前の化学シフトと滴定の終点での化学シフトの差をプロットした。グラフの横軸はSB-HMGのアミノ酸番号を表し、シアン色の短いバーでマークしたアミノ酸はPro、紫でマークしたアミノ酸は帰属ができていないアミノ酸を示している。赤いバーは化学シフト変化の变化量が平均値 $\pm$ SDより大きかったアミノ酸の結果を表している。

(e) – (f) AID (e)・pAID (f)を滴定した場合の滴定曲線。

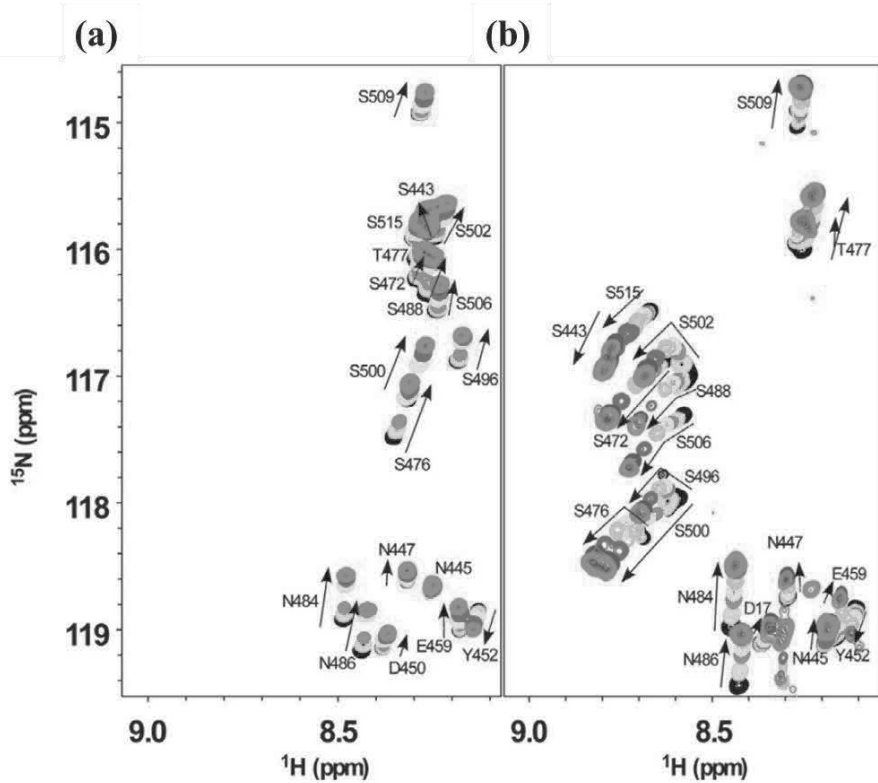


図4-8 (a) (b)  $^{15}\text{N}$ ラベルしたAID・pAIDに対する滴定実験

(a) AIDにSB-HMGを滴定したときの化学シフト変化

[SB-HMG]/[AID]=0.0(黒), 0.1(緑), 0.3(赤), 0.7(シアン), 1.0(黄), 1.5(紫),  
2.0(青), 3.0(マゼンタ)

(b) pAIDにSB-HMGを滴定したときの化学シフト変化

[SB-HMG]/[pAID]=0.0(黒), 0.3(緑), 1.0(赤), 2.0(シアン), 3.0(黄), 5.0(紫),  
7.0(青), 9.0(マゼンタ)

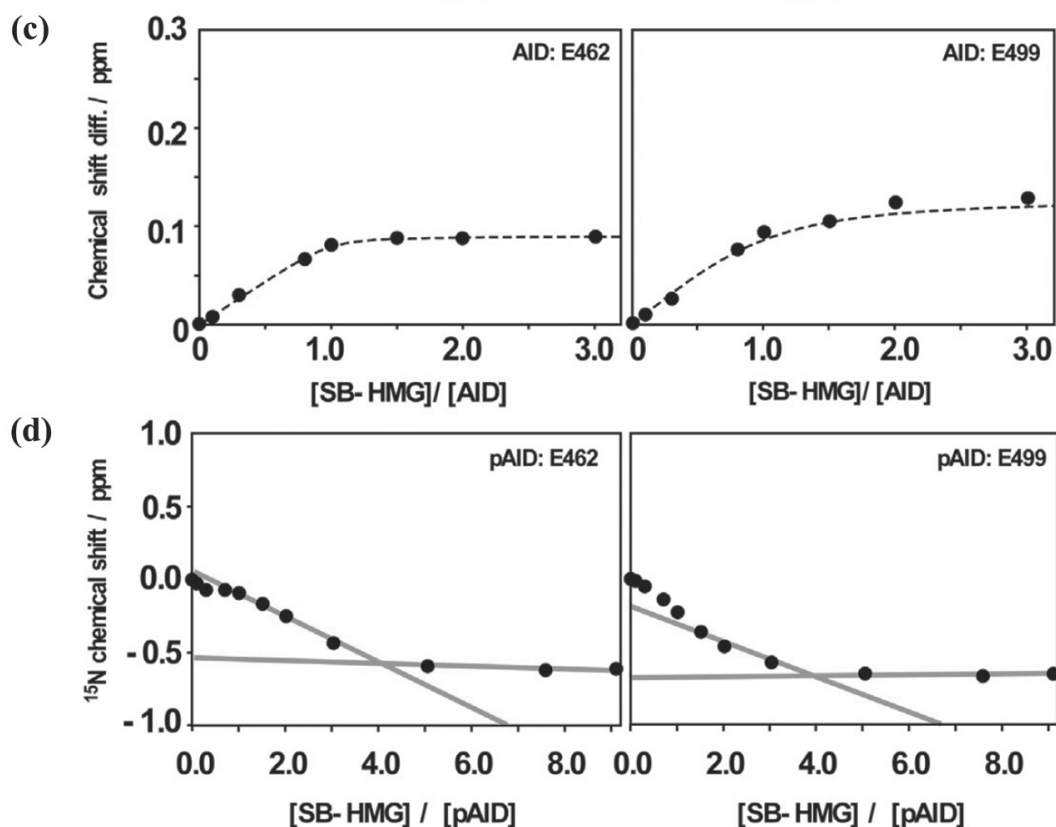


図4-8 (c) (d) <sup>15</sup>NラベルしたAID・pAIDに対するSB-HMG滴定実験の解析①

(c) AIDに対する滴定曲線。左は高親和性残基，右は低親和性残基の結果の例である。どちらのグラフも[SB-HMG]/[AID]=1.0付近で頭打ちになっていることから，SB-HMGとAIDは物質質量比 1:1で相互作用することが分かる。

(d) pAIDに対する滴定曲線。グラフから，SB-HMGとpAIDは物質質量比 4:1で相互作用することが分かる。

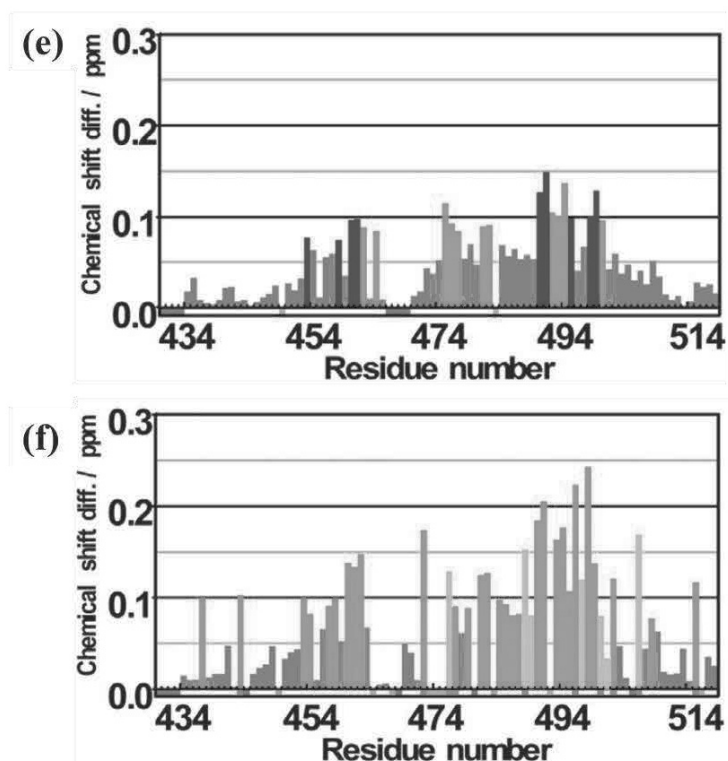


図4-8 (e) (f)  $^{15}\text{N}$ ラベルしたAID・pAIDに対するSB-HMG滴定実験の解析②

グラフの横軸はAID (pAID) のアミノ酸番号を表し、シアンの短いバーでマークしたアミノ酸はPro, 紫でマークしたアミノ酸は帰属ができていないアミノ酸を示す。

(e) SB-HMGを滴定したときのAIDの化学シフトの変化。滴定前の化学シフトと滴定の終点での化学シフトの差をプロットした。赤と青のバーは化学シフト変化の变化量が平均値 $\pm$ SDより大きいアミノ酸を指し、青いバーは高親和性残基、赤いバーは低親和性残基に分類されるアミノ酸を示す。

(f) SB-HMGを滴定したときのpAIDの化学シフトの変化。黄緑のバーは、滴定による化学シフトの移動が屈曲したアミノ酸を示す。横軸にあるオレンジのバーは、化学シフト変化の軌跡を正確に追跡できなかったアミノ酸を示す。



### (3) リン酸化およびdsDNAの結合によるAIDとBID-HMGの分子内相互作用の変化

AIDがBID-HMGと分子内相互作用を形成する様式を調べるため、AB-HMGとAIDの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを比較した。AB-HMGは可溶性が低く、IDRの領域が広いため、主鎖スペクトルの帰属が困難であった。そこで、単離された状態で帰属したAIDとSB-HMGの化学シフトと比較することで、いくつかのSer残基についてはシグナルの割り当てができた (図4-9)。

AB-HMGとAIDのみの断片のスペクトルを比較すると、化学シフトに顕著な違いがみられるアミノ酸残基がみられた (図4-9 (a))。これは、AB-HMG分子内でAIDの一部がほかの領域と分子内相互作用をしていることを示している。AB-HMGにdsDNAを加え反応させた場合、AB-HMGに含まれるAIDのスペクトルは、単離した状態のAIDのスペクトルと完全に一致することはなかった(図4-9 (b))。これは、AB-HMG内のAID領域がdsDNA存在下でも分子内で他領域に接触する部分があり、完全に独立した状態にはなっていないことを表している。

pAB-HMGとpAIDのみの断片のスペクトルの比較をすると、リン酸化されていない断片同士の比較をした場合よりも大きな違いがみられた (図4-9 (c))。おそらくpAB-HMG内では、AB-HMGで見られた分子内相互作用よりも強い分子内相互作用が起きていると予想できる。dsDNAを反応させた場合も、両者の化学シフトの差が縮むことはなかった。これは、dsDNAがpAB-HMG内で起こる分子内相互作用を阻害していないことを表している (図4-9 (d))。

AB-HMGとpAB-HMGの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを完全に帰属できていないので、それぞれの分子内で起こる相互作用についての考察は限定的である。しかしスペクトルの比較から、リン酸化の有無に関わらず分子内相互作用は起こっており、dsDNAの存在下でもその相互作用は残ったままであることが分かる。た

だし、滴定実験の結果にあるように、AIDあるいはpAIDとHMG間の親和性はリン酸化の影響が表れている。

AB-HMG内のBID-HMG領域側で帰属できたシグナルをモニターし、分子内相互作用を確認した (図4-10)。IDRからの強いシグナルのために多くのシグナルが判別できなくなったが、いくつかの独立したシグナルを用いて部分的な解析を行った。HMG, AB-HMG, pAB-HMGのS572, K621の化学シフトを比較すると、リン酸化の有無に関わらずBID-HMGはAIDと分子内相互作用をしていることが示唆された。次に、単離されたHMGとdsDNAの相互作用スペクトルと、AB-HMGあるいはpAB-HMG内のHMGとdsDNAとの相互作用スペクトルを比較した。A606, K621, G553の化学シフトの変化を見ると、dsDNA存在下で分子内相互作用がリン酸化の影響を受けているようにも見える。このようなdsDNAの添加によるリン酸化依存的なHMGのスペクトルの変化は、AIDとpAIDのBID-HMGへの結合の様式や親和性が変化することで、HMGとdsDNAの結合の様式も変わるためだと考えられる。

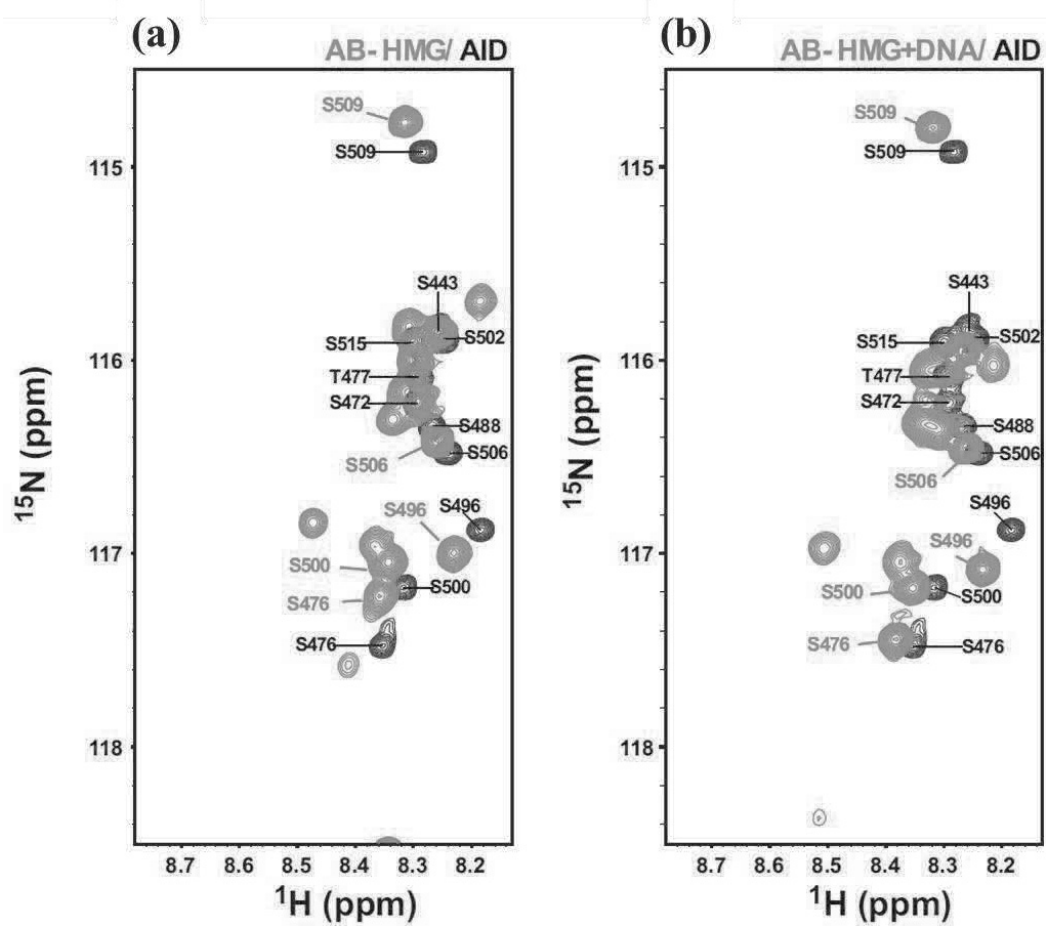


図4-9 (a) (b) AB-HMGとpAB-HMGとdsDNAとの結合による化学シフトの変化①

(a) AB-HMG (赤) とAID断片 (黒) のスペクトルの比較。

(b) AB-HMG + DNA (赤) とAID断片 + DNA (黒) のスペクトルの比較。

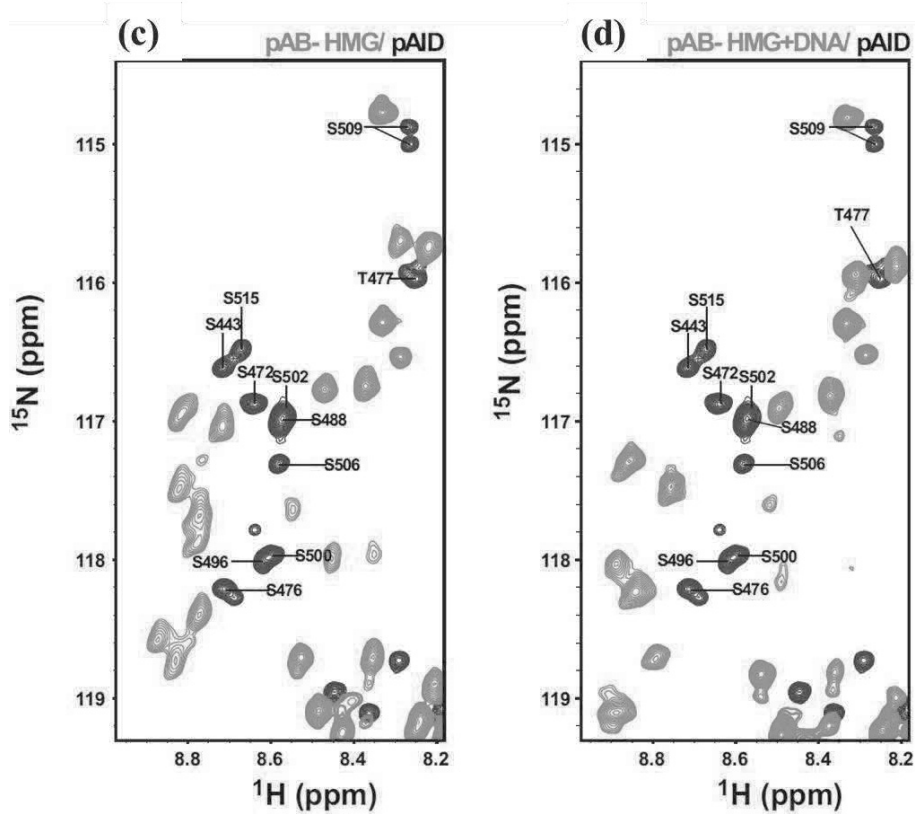


図4-9 (c) (d) AB-HMGとpAB-HMGとdsDNAとの結合による化学シフトの変化②

(c) AB-HMG (赤) とAID断片 (黒) のスペクトルの比較。

(d) AB-HMG + DNA (赤) とAID断片 + DNA (黒) のスペクトルの比較。

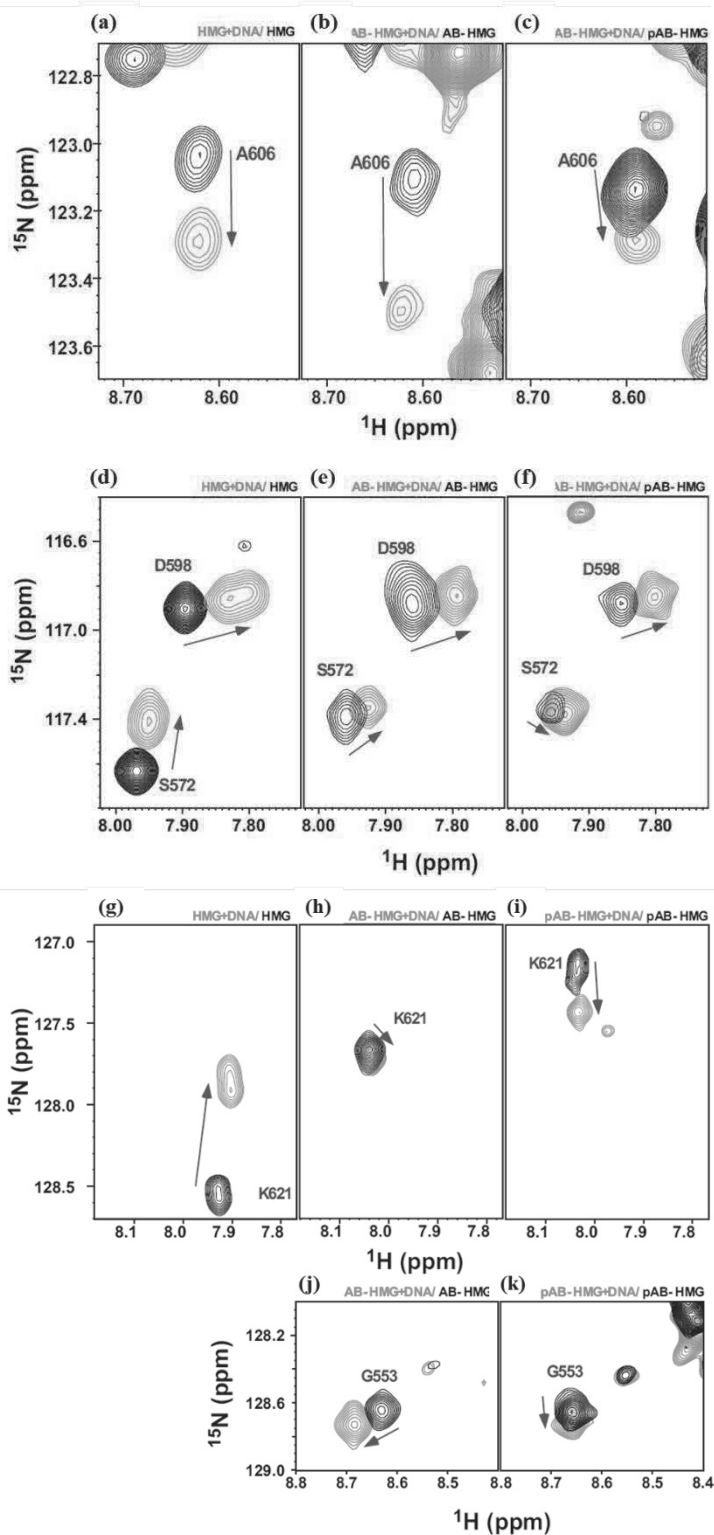


図4-10 AB-HMGおよび pAB-HMG内のHMGへの DNAの結合による化学シフトの変化

(a), (d), (g) HMG (黒)と HMG+DNA (赤) のスペクトルの比較

(b), (e), (h), (j) AB-HMG (黒)と AB-HMG+DNA (赤) のスペクトルの比較

(c), (f), (i), (k) pAB-HM (黒)と pAB-HMG+DNA (赤) のスペクトルの比較

G553 は BID 領域にあるため、HMG 単独での滴定のデータは存在しない。

#### 4.4 考察

本研究において共同研究を行った金沢大学・古寺哲幸教授らによる HS-AFM による解析は、ヘテロダイマーであるリン酸化 dFACT と非リン酸化 dFACT それぞれの分子的な特徴を可視化することに成功した。実験方法の詳細や結果の妥当性については参考論文④を参照し、以下には結果の概要のみを記載する。

野生型 dFACT (dFACT-WT)は、Sf9 昆虫細胞で自発的にリン酸化され、10 か所すべてのリン酸化サイト (Ser / Thr)が完全にリン酸化された状態で発現する (Tsunaka *et al.*, 2009)。これをリン酸化 dFACT とした。リン酸化される Ser および Thr をそれぞれ Ala に置換した dSSRP1 を含む dFACT (dFACT-10SA)を作成し、非リン酸化 dFACT とした。dFACT-WT および dFACT-10SA の分子的特徴を HS-AFM によって直接可視化すると、両方の分子は大きな球状ドメインとロングテール領域からなるように見えた (図 4-11 A, B)。過去の発表論文(14)を考慮すると、大きな球状ドメイン (GD1) は dSPT16 (401-887)と dSSRP1 (1-404) からなる構造ドメイン、ロングテール領域は、HMG に隣接する IDR に割り当てることができる。注意深く観察したところ、IDR の部分にはさらに 2 つの小さな球状ドメイン (GD2 および GD3) があることがわかった。GD1・GD2・GD3 をつなぐ IDR をそれぞれ、IDR1-2, IDR2-3 とする(図 4-11 C)。GD2 はロングテール領域の中央付近に一時的に現れ、まもなく消えた。このとき GD2 の出現時間は、dFACT-WT の方が dFACT-10SA よりも長かった。また IDR の長さは、dFACT-WT の方がわずかに短く、特に IDR1-2 は一時的に明らかに短くなることがあった。一方で、dFACT-WT と dFACT-10SA の IDR2-3 の長さの経時的な変化には、大きな差は見られなかった。

上記の各分子の構造の微小な変動を定量的に評価するために、画像解析を行った。図4-11 Cに記載した各パラメーターの解析結果は表4-1と図4-12に記載し

た。H1 (GD 1 の高さ)とH3 (GD3の高さ)は、dFACT-WTとdFACT-10SAの間で差は見られず、両者のGD1およびGD3には構造上の特徴に違いがないことを示している (表4-1)。H2の場合、dFACT-WTの方がdFACT-10SAよりも明らかに高かった。また、dFACT-10SAではH2の値のピークが2つ (1.1 nmと1.7 nm付近)に分かれていたことから、GD2には構造的に少なくとも2つの状態が存在することが示唆された (図4-12)。また2つの状態のうち、H2が1.1 nm付近に近づいた状態の方が存在しやすいことも分かった。一方で、dFACT-WTもH2の値が1.1 nmと1.6 nm付近にピークを持ち、構造的に2つの状態を遷移していると解釈すると、H2の値が1.6 nmある時間が最も長いことから、dFACT-WTではH2が高い状態の方が存在しやすいと推測できる。

先行研究の結果から、HMGの高さは $\sim 1$  nm、IDRの高さは 0.4~0.6 nmと見積もられている (Kasai *et al.*, 2005)。ここから、H2の値のうち1.1 nmはGD2がHMG単独で存在している状態を示し、1.6~1.7 nmはHMGにIDRが結合した状態を示していると予想することができる。D2-3 (GD2とGD3の距離)については、dFACT-WTとdFACT-10SAの間で有意な差は見られなかった (図4-12)。一方で、D1-2 (GD1とGD2の距離)を測定したところ、dFACT-WT ( $15 \pm 5$  nm) は dFACT-10SA ( $17 \pm 5$  nm) よりも約 2 nm短くなった (表4-1)。この結果から、リン酸化によりHMGとの結合が促進されるのはIDR1-2であり、IDR2-3は関わっていないことが分かった。IDR1-2にはAID領域が含まれており、これがリン酸化されることでHMGとの相互作用が促進されるためと考えることができる。

HS-AFMの結果をまとめると、GD2はHMG単独で形成された状態と、HMGにIDR1-2が結合した状態で形成された状態の、少なくとも2状態を常に遷移していることが分かった。さらに、dFACT-WTの方がHMGにIDR1-2が結合した状態にある時間が長く、この原因はIDR1-2にあるAIDのリン酸化にあることも分かった。

つまり、AIDがリン酸化されるとHMGとの動的複合体が形成されやすくなることを示している。

HS-AFMとNMRによる分析により、AIDにある複数のSerのリン酸化が、AIDとDNA結合因子であるBID-HMGとの分子内相互作用を調節していることが分かった。これまでの結果から、FACTとDNAの結合について、次のような動的複合体形成による調節機構を提案する。

1. AIDはBID-HMGと分子内相互作用をする。AIDのリン酸により、AID上のBID-HMGの結合サイトが2倍の領域に広がる。
2.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの比較から、非リン酸化AIDとBID-HMGとの分子内相互作用は、AB-HMG内のAIDのスペクトルと単離されたAIDのスペクトルに大きな差がみられなかったことから、比較的弱いものであると判断することができる。HS-AFMの結果も踏まえると、非リン酸化AIDとBID-HMGとの間の分子内相互作用は、動的かつ一過性のものであるということが出来る。
3. AIDはリン酸化されると、BID-HMGとの分子内相互作用は強くなる。これは、単離したpAIDと比較してpAB-HMGのもつリン酸化Serのスペクトルの変化が大きいことから推測できる。また、pAB-HMGはdsDNA存在下でも分子内相互作用を維持していた。つまり、リン酸化によりFACTとヌクレオソームDNAとの相互作用が阻害されるということを示している。HMGのいくつかのアミノ酸残基は、pAIDがHMGに相互作用している状態でも、dsDNAを添加することでその化学シフトが変化した。HS-AFMによる観察から、pAIDとBID-HMGによって形成されると推測される球状ドメインは、HMGにIDRが結合した状態と離れた状態を遷移する動的複合体であることが示された。また、FACTがリ



リン酸化された場合、リン酸化されていない状態と比較して、HMGとIDRが結合した複合体が形成される確率が高いことも分かった。まとめると、FACTでは、動的かつ一過的な分子内相互作用が行われており、高密度のリン酸化によりBID-HMGとAIDとの接触の確率が上昇することで、dsDNAとの相互作用が阻害されると考えることが可能である (図4-13)。

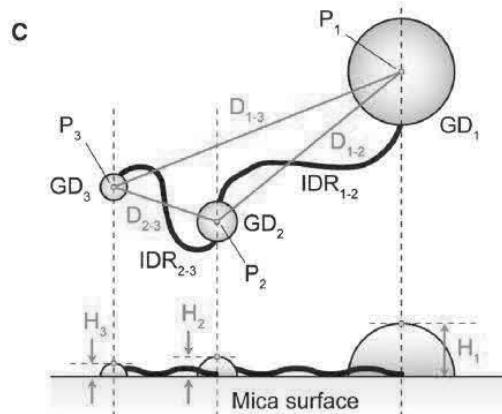
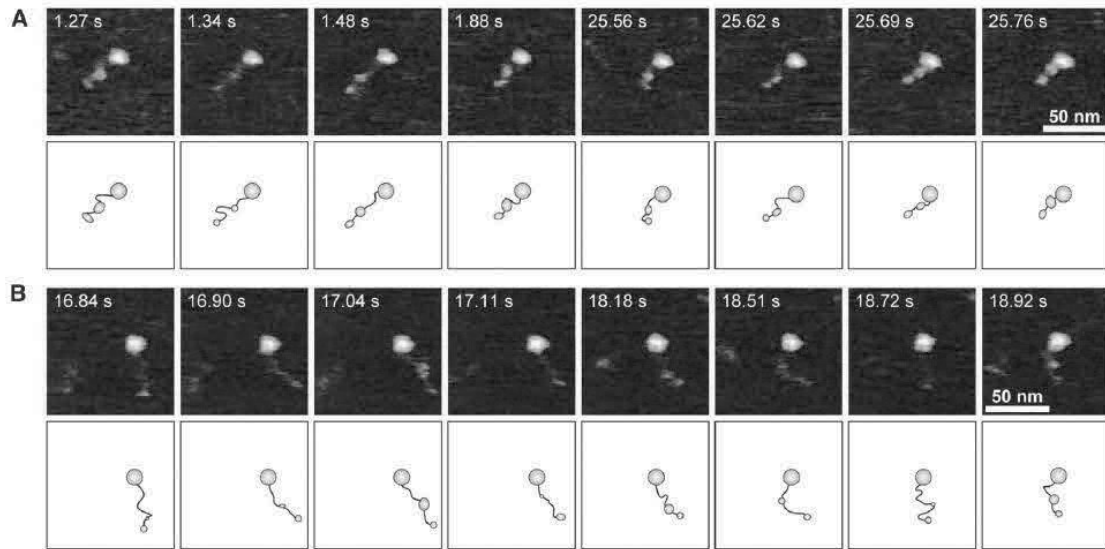
dSSRP1-HMGの構造は、酵母のNhp6aと類似しており、それぞれがもつDNA結合表面の構造も類似している (Kasai *et al.*, 2005)。NMRによる構造決定によると、Nhp6aとDNAの複合体では、Nhp6a 内のL字型をしたHMGがDNAの副溝と接触し、HMGのN端側にあるBIDが主溝と結合していることが分かっている (Murphy *et al.*, 2001)。Nhp6a のDNA結合表面には多くの保存性の高いLysとArgが含まれ、これがDNAの糖 - リン酸骨格と静電的な相互作用をすることでDNAと複合体を形成すると考えることができる。本研究におけるNMRのデータも踏まえると、dSSRP1においても、DNAとAIDはHMGと静電的な相互作用すると予想され、リン酸化の有無に関わらず、BID-HMG領域上のほぼ同じようなサイトを使っていることが予想された。

HS-AFMのデータは、FACT-IDRの動的複合体形成がリン酸化に応じて劇的に変化することを示している。NMRのデータから、AIDが高密度でリン酸化されると、HMGを含むDNA結合因子との結合部位が増加することも分かった。高密度のリン酸化は、リン酸基同士の静電的な反発力を強め、非リン酸化AIDと比べてAID領域が折りたたまれることなく広がった状態を作り出している可能性があり、これによりHMGがpAIDに相互作用する確率を高くしていると推測できる。つまり、リン酸化によるHMG結合サイトの増加は、pAIDとHMGの複数存在する複合体間の動的平衡に起因すると考えることができる。pAIDとHMGの複合体形

成の確率が上がると、結果的にDNAとHMGの相互作用のチャンスは減少する。以前の研究で、FACTにあるリン酸化サイトに同時に4か所、もしくは6か所変異を入れた場合、変異の数に応じてリン酸化FACTとDNAとの相互作用の強度が変化した。変異箇所が増えることにより、DNAとリン酸化FACTの相互作用が強化されたことから、リン酸化FACTの阻害メカニズムはやはり、本質的に静電的な作用に基づいていると考えることができる。

今回示した調節機構の特徴の一つは、連続して並んだAID領域とBID領域が同一分子内のHMGに結合することで、FACTとDNAの結合能を調節している点である。IDRが連続して連結されることで、リン酸化IDRとHMGの接触確率は高まると考えられる。

本研究は、NMRとHS-AFMによる分析を組み合わせることで、構造を持たぬまま機能するような天然変性タンパク質の特性を明らかにすることに成功した。この手法は、IDRが重要な働きをされると考えられているその他多くのタンパク質やその複合体に対しても有効であると考えられる。



#### 図4-11 d-FACT-WTとdFACT-10SAのHS-AFMによるイメージ

(参考論文③, Figure 2から引用)

Typical HS-AFM images showing the molecular features of dFACT-WT (A) and dFACT-10SA (B). These HS-AFM images were clipped from the movie files (see Movie S1 for dFACT-WT and Movie S2 for dFACT-10SA). Every image was taken at 67.08 ms/frame (~15 frames/s). The time from the beginning of the clip is indicated at the upper left of each image. Scanning area,  $100 \times 100 \text{ nm}^2$  with  $80 \times 80$  pixel; Z-scale, 4.0 nm. The observed molecular features of dFACT are schematized according to the definitions in C. These schematics were drawn freehand by tracing the AFM images by visual estimation. (C) Top-view (upper) and side-view (lower) schematics simply represent the characteristics of dFACT observed by HS-AFM. Gray-colored ellipses and black-colored thick solid lines represent the GDs and the IDRs, respectively. The symbols used for image analysis are also depicted. For every image, we selected three points (P1–P3) (green dots) representing the peak heights ( $H_i$ ) in their respective GDs. Using these points, a distance from the highest point of one GD to that of another was determined. For example, the distance from P1 of GD1 to P2 of GD2 was expressed as D1–2. In some images, the appearance of GD2 or GD3 was unclear; there was no point with distinct heights around the area usually seen. In this case, P2 and P3 with the highest height around the middle and the end of the IDR were selected.

表 4-1 HS-AFM による画像解析結果

(参考論文③, Table 1 から引用)

Parameter	dFACT-WT	dFACT-10SA
H <sub>1</sub>	3.9 ± 0.3 nm	3.9 ± 0.3 nm
H <sub>3</sub>	1.6 ± 0.3 nm	1.6 ± 0.4 nm
D <sub>1-2</sub>	15 ± 5 nm	17 ± 5 nm
D <sub>2-3</sub>	10 ± 3 nm	11 ± 4 nm
D <sub>1-3</sub>	21 ± 5 nm	23 ± 7 nm
D <sub>1-2</sub> /(D <sub>1-2</sub> + D <sub>2-3</sub> )	0.59 ± 0.11	0.62 ± 0.11
Number of molecules analyzed	3	3
Number of frames analyzed	5770	4586

Heights and distances are shown by mean ± SD. Units of areas are arbitrary. The accuracy of the HS-AFM measurement for the *z*-direction (i.e., background noise) was 0.15 nm. The standard deviations of the Gaussian fits were therefore restricted to >0.15 nm. Note that we did not apply Gaussian fittings to the H<sub>2</sub> distributions because the results obtained had no statistical relevance.

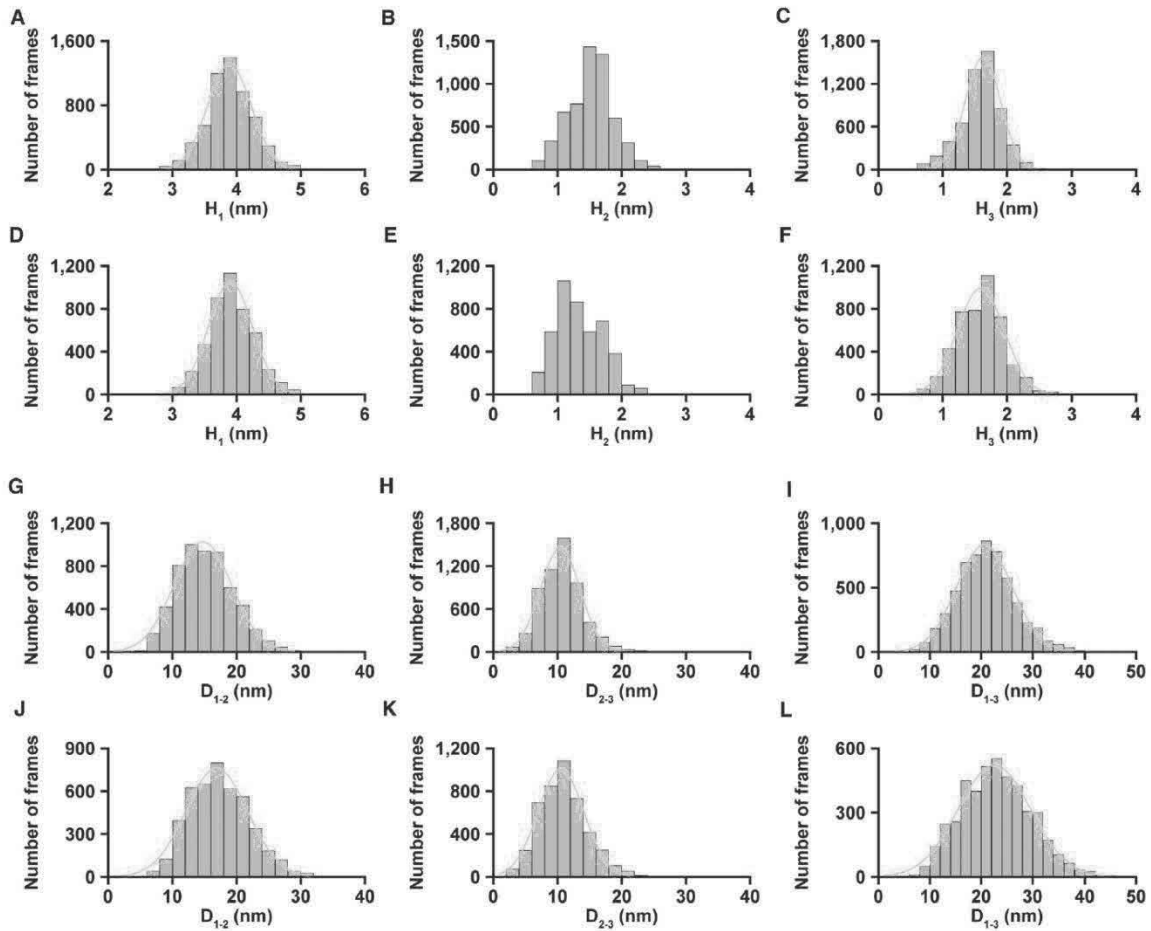


図4-12 d-FACT-WTとdFACT-10SAのHS-AFMの画像解析

(参考論文③, Figure 2から引用)

Height distributions of three GDs and distributions of distance between two GDs of dFACT. Height distributions ( $H_1$ – $H_3$ ) are shown for dFACT-WT (A–C) and dFACT-10SA (D–F). Distance distributions ( $D_{1-2}$ ,  $D_{2-3}$  and  $D_{1-3}$ ) are shown for dFACT-WT (G–I) and dFACT-10SA (J–L). Green lines represent single-Gaussian fitting. Note that we did not apply Gaussian fittings to the  $H_2$  distributions because the results obtained had no statistical relevance. A summary of the analysis is presented in 表 4-1. These results were obtained from analysis applied to three molecules for each construct.

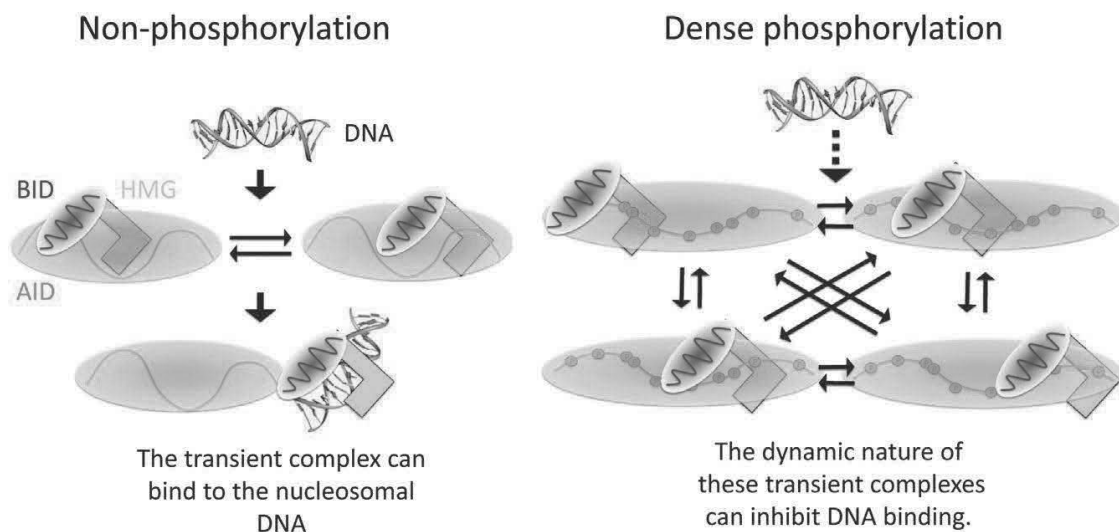


図 4-13 FACT のリン酸化依存的なヌクレオソーム DNA 結合阻害機構

左図は、リン酸化がない場合の AB-HMG 分子内相互作用と DNA との結合の仕方を模式的に表したものである。AID がリン酸化されていない場合、BID-HMG は一時的に DNA と複合体を形成することができる。

右図は、AID がリン酸化された場合の様子を表している。AID 上の高密度なリン酸化は静電的な反発力により、AID 領域が折りたたまれることを阻害する。その結果、BID-HMG は pAID 領域と接触しやすくなり、複数の状態で複合体を形成しする機会が増える。赤い楕円は負電荷、紫の楕円は正電荷が広がる領域を示し、HMG はシアンで着色された L 字のボックスで表した。赤い点はリン酸化サイトを示す。

## 参考文献

Brewster, N. K., Johnston, G.C., Singer, R.A. (2001). A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 3491-3502.

Dyson, H. J. (2011). Expanding the proteome: disordered and alternatively folded proteins. *Q. Rev. Biophys.*, 44, 467-518.

Dyson, H. J., Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 197-208.

Formosa, T. (2012). The role of FACT in making and breaking nucleosomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1819, 247-255.

Fuxreiter, M. (2012). Fuzziness: linking regulation to protein dynamics. *Mol. Biosyst.*, 8, 168-177.

Garza, A. S., Ahmad, N., Kumar, R. (2009). Role of intrinsically disordered protein regions/domains in transcriptional regulation. *Life Sci.*, 84, 189-193.

Iakoucheva, L. M., Radivojac, P., Dunker, A. K. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.*, 32, 1037-1049.



Kasai, N., Tsunaka, Y., Tate, S. (2005). Solution structure of the HMG-box domain in the SSRP1 subunit of FACT. *J. Biomol. NMR.*, 32, 83-88.

Mittag, T., Kay, L. E., Forman-Kay, J. D. (2010). Protein dynamics and conformational disorder in molecular recognition. *J. Mol. Recognit.*, 23, 105-116.

Miyagi, A., Tsunaka, Y., Ando, T. (2008). Visualization of intrinsically disordered regions of proteins by high-speed atomic force microscopy. *Chem.Phys. Chem.*, 9, 1859-1866.

Murphy, E. C., Zhurkin, V. B., Clore, G. M. (2001). Structural basis for SRY-dependent 46-X, Y sex reversal: modulation of DNA bending by a naturally occurring point mutation. *J. Mol. Biol.*, 312, 481-499.

Nakayama, T., Nishioka, K., Hirose, S. (2007). *Drosophila* GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading. *Genes Dev.*, 21, 552-561.

Reinberg, D., Sims, R. J. (2006). 3rd de FACTo nucleosome dynamics. *J. Biol. Chem.*, 281, 23297-23301.

Sarno. S., Vaglio. P., Pinna. L. A. (1996). Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. Purification and kinetic analysis. *J. Biol. Chem.*, 271, 10595- 10601.

Shimajima, T., Okada, M., Hirose, S. (2003). *Drosophila* FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. *Genes Dev.*, 17, 1605-1616.

Sugase, K., Dyson, H. J., Wright, P. E. (2007). Wright P.E. Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature*, 447, 1021-1025.

Tsunaka, Y., Toga, J., Morikawa, K. (2009). Phosphorylated intrinsically disordered region of FACT masks its nucleosomal DNA binding elements. *J. Biol. Chem.*, 284, 24610-24621.

Uversky, V. N., Dunker, A. K. (2010). Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1804, 1231-1264.

Uversky, V. N., Dunker, A. K. (2012). Multiparametric analysis of intrinsically disordered proteins: looking at intrinsic disorder through compound eyes. *Anal. Chem.*, 84, 2096-2104.

Uversky, V. N., Oldfield, C. J., Dunker, A. K. (2008). Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 215-246.

Uversky, V. N., Oldfield, C. J., Dunker, A. K. (2009). Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases. *BMC Genomics.*, 10 (Suppl 1), S7.

Vuzman, D., Levy, Y. (2012). Intrinsically disordered regions as affinity tuners in protein-DNA interactions. *Mol. Biosyst.*, 8, 47-57.

Winkler, D. D., Muthurajan, U. M., Luger, K. (2011). Histone chaperone FACT coordinates nucleosome interaction through multiple synergistic binding events. *J. Biol. Chem.*, 286, 41883-41892.

Wright, P. E., Dyson, H. J. (2009). Linking folding and binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19, 31-38.

Xin, H., Takahata, S., Formosa, T. (2009). yFACT induces global access

## 第5章 結語

本研究では、異なる生物種から得られたタンパク質を対象に、構造と機能の関係について検討を行った。ここで取り上げたタンパク質は、構造やはたらきだけみれば、共通点はほとんどないように思えるが、いずれもほかのタンパク質と複合体や重合体を形成することで機能を発揮するという共通点がある。

生体内では、ほとんどのタンパク質が別の分子と複合体を形成し、あるいは、単一のタンパク質同士が重合した状態で存在する。またその分子間相互作用は状況に応じて素早く調節され、この調節に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。タンパク質の実際の機能を検証するためには、単体のタンパク質を対象とした研究では限界があり、複数の測定技術を組み合わせた実験データの検証が必要になる。

バイオインフォマティクスにより、タンパク質の立体構造はアミノ酸配列の比較や機能から予測することができるようになった。しかし、タンパク質内の構造を持たない領域に関しては、まだまだ情報不足である。また、複合体を形成した際の個々の分子が受ける影響などを考慮すると、生体内でのタンパク質の実際の挙動を知るためには、新たな手法の開発も必要になるだろう。

本研究において、NMR と HS-AFM による分析を組み合わせることで、IDR を持つタンパク質の特性を明らかにすることに成功した。立体構造がはっきりと決定できていない状態でも、分子間の相互作用の仕組みや、動的複合体形成の証明ができるこの手法は、同じように IDR を持つタンパク質の機能調節の研究に適用できる手法である。

また本研究では、タンパク質の分子的な特徴に対する新たな知見が得られることにより、これまで間接的な証拠の積み重ねにより立証されてきた現象につ

いて、再度検証する必要があることを強く述べている。特に細菌のべん毛研究の歴史は長く、タンパク質や遺伝子に関する情報ほとんどないころから、主には顕微鏡による観察をもとにべん毛モーターの仕組みは解釈されてきた。べん毛モーターは微細で、プロトン駆動力を利用して回転しており、エネルギー変換効率が非常に高い。このモーターのトルク発生の仕組みやエネルギー変換の仕組みが解明されれば、わずかなエネルギーで生体内を移動できる有機ナノマシンの開発にも応用できる。しかし、その仕組みの解明には相当な時間がかかっており、トルク発生の機構についても推測の域を出ない。その原因として、べん毛を構成するタンパク質には自己集合性があるため結晶化が困難であること、生体内で重合することで機能すること、また重合体自体が非常に大きいために全容がつかめないことが挙げられる。分子間相互作用についての理解も難しく、原子レベルでの特徴を考慮したモデルを構築するには情報が足りていないのが現状である。近年クライオ電子顕微鏡での詳細な観察や NMR による測定により、徐々にべん毛を構成する各種部品 (フックやモーター) の機能とそれを構成するタンパク質の動的な変化が観測されるようになった。今後べん毛に関しては新たな手法と知見をもとに、実際のべん毛の回転とこれまで提唱されてきたモデルとの比較検討が進んでいくことになるだろう。

## 謝辞

これまでの研究を成すにあたり、研究の機会を与えてくださった、広島大学大学院統合生命科学研究科教授・楯真一様、県立広島大学生命環境学部名誉教授・相沢慎一様に深く感謝いたします。またサルモネラ変異株作成の技術をご教授いただきました、ユタ大学教授・Kelly T. Hughes 様も御礼申し上げます。

広島大学理学部化学科 (大学院統合生命科学研究科) 分子生物物理学研究室でお世話になりました学生の皆様、タンパク質の精製法や NMR の測定技術を丁寧に教えていただけたおかげで、物理化学に対して知識の浅い初心者が、何とか研究成果を出せるまでに至りました。

県立広島大学大学院生命科学科所属の研究員であった際には、JST・CREST 研究課題「生物ナノマシン回転運動の一般化作動機構の解明」の研究に幸運にも携わることができました。細菌の種類や取り扱い方から始まり、べん毛に関する基本的な知識の習得、電子顕微鏡の技術習得、海外での遺伝子操作等分子生物学的手法の習得など、さまざまな経験をさせていただきました。公での発表の機会も多数あり、所属していた学生の皆様のご協力のもと、新しい知見も得ることができました。

これまで私の研究に関わっていただいたすべての皆様に、心よりお礼申し上げます。ありがとうございました。