

(様式 1-1)

提出日：2025 年 5 月 8 日

2024 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除してください。）

クライオ電子顕微鏡

(2) 研究代表者

氏名：小嶋 誠司

所属機関名・部局名・職名：名古屋大学 大学院理学研究科 教授

(3) 研究課題名（申請時に記載したものと同一課題名を記入してください。）

ビブリオ菌べん毛モーター固定子複合体の立体構造解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：加藤 貴之 教授 （研究室名：電子線構造生物学）

(5) 研究成果の概要

*背景および目的、方法と結果について、公開して差し支えない範囲で記載。

細菌べん毛モーターは細胞膜内外の H^+ または Na^+ 駆動力を回転力に変換するナノマシンで、エネルギー変換は膜蛋白質複合体の固定子内で行われる。固定子は回転子周囲の細胞壁に固定され、活性化するとイオンを流し、回転子と相互作用してモーターを駆動する。近年固定子複合体の立体構造が解明されたが、そのイオン透過経路は閉じており不活性型であった。また固定に重要な B サブユニットのペリプラズム側構造は見えておらず、モーターに組み込まれた活性化型固定子の構造は不明である。本研究では、B サブユニットを含む固定子の全体像を明らかにするため、ビブリオ菌の Na^+ 駆動型 PomA/PomB 固定子複合体を対象とし、1) B サブユニットの天然変性領域と推定されている部分を欠失させた変異体の構造解析、2) 化学修飾によりイオン透過能を高めた固定子の構造解析、の 2 つのテーマに取り組んでいる。

1) に関しては PomB の膜貫通領域とペプチドグリカン結合(PGB)ドメインを繋ぐ 80 残基ほどが天然変性領域と予測されるため、この領域を欠失させた PomA/PomB(Δ 71-150)固定子は大腸菌で過剰発現・精製し、クライオ電顕による単粒子解析に耐えうるサンプルの供出を試みた。Strep-tagII をアフィニティタグに用いたことで精製度が上がり、負染色レベルでは均一性が確認できるところまで来ているが、収量が低く、単粒子解析に十分な量を得ることができなかったため、本年度は設備利用に至らなかった。

2) に関しては、細胞内では PomB の膜貫通領域の直後に存在する両親媒性ヘリックス（プラグと呼ばれている）の化学修飾によりイオン透過能が高まること（未発表）を用いて、精製した固定子をグリッドに乗せる直前に化学修飾し、活性化型構造を捉えることを期待して試料を準備した。蛋白質研究所の Talos arctica クライオ電子顕微鏡を利用し、スクリーニングで得られたデータの解析を行ったところ、まだサンプルの状態が適切でなく、2次元平均化を行う段階で止まっている。サンプル調製法の改良を現在進めている。