

Title	Structural insights into peptidoglycan hydrolysis mechanism by the bacterial flagellar rod cap protein FlgJ
Author(s)	菊地, 祐希
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57746">https://hdl.handle.net/11094/57746</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【90】

氏名	菊地祐希
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第23947号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	Structural insights into peptidoglycan hydrolysis mechanism by the bacterial flagellar rod cap protein FlgJ (細菌べん毛ロッドキャップ蛋白質FlgJのペプチドグリカン加水分解機構に対する構造学的知見)
論文審査委員	(主査) 教授 難波 啓一 (副査) 教授 中川 敦史 教授 谷澤 克行 准教授 池上 貴久

## 論文内容の要旨

The axial structure of the bacterial flagellum consists of three parts: the filament, the hook and the rod. Construction of the axial structure requires cap complexes attached to its growing end. FlgD and FlgH form the cap complex necessary for hook and filament growth, respectively. Since the rod must penetrate the peptidoglycan (PG) layer, the rod cap is expected to have a PG-hydrolyzing activity. FlgJ is a member of the GH73 family and a putative rod cap protein. The PG-hydrolyzing activity of FlgJ should be well controlled both spatially (at the tip of the nascent rod) and temporally (during rod growth) to avoid lysis

and to make a hole of an appropriate size for rod formation.

To elucidate the molecular mechanism of PG-hydrolysis and its regulation, I determined the crystal structure of the C-terminal PG-hydrolyzing domain of FlgJ at 1.7 Å resolution and characterized its enzymatic activity. I analyzed the domain composition of FlgJ by limited proteolysis and found that a C-terminal stable fragment, FlgJ<sub>120-316</sub>, was suitable for X-ray crystallographic analysis. FlgJ<sub>120-316</sub> was found to consist of an α-helical core domain and a small sub-domain composed of β-strands and loops, and shows a structural similarity to hen egg white lysozyme. This similarity allowed the assignment of putative residues involved in the catalytic reaction or the substrate recognition. E184 and E223 were assigned as catalytic residues, and it was confirmed by mutational analyses. Since the distance between E184 and E223 (15.5 Å) is too large to be involved in the PG-hydrolyzing reaction, the active cleft between the core and the sub-domain should be closed upon substrate binding. Mutations of K207, which is located on the loop of the sub-domain and is well conserved in the GH-73 family, considerably reduced the activity and increased  $K_{m, app}$ , suggesting that K207 triggers the movement of the sub-domain upon substrate binding.

Surprisingly, the PG-hydrolyzing activity of FlgJ<sub>120-316</sub> showed an unusually high sensitivity to cation concentration and was almost diminished at a physiological cation concentration, suggesting that an activation mechanism must be present for rod formation.

## 論文審査の結果の要旨

本論文申請者は、細菌べん毛ロッドキャップ蛋白質と考えられているFlgJ蛋白質の機能解明を目指した研究を行った。まず、FlgJのC末端側にペプチドグリカン加水分解ドメインが存在し、N末端欠損変異体が野生型に比べて加水分解活性が10倍上昇することを明らかにした。さらに、このペプチドグリカン加水分解ドメインの1.7Å分解能のX線結晶構造解析に成功し、得られた構造を基に活性部位と関連するアミノ酸残基を特定し、その情報を基に作製した変異体を用いた酵素学的研究を行った。これら一連の研究により、FlgJ蛋白質のN末端領域が活性制御に重要であること、活性に直接関与するアミノ酸残基を同定したこと、金属イオンが活性を阻害することなど、FlgJ蛋白質の生化学的諸性質を明らかにした。これらの結果から、細菌がべん毛を形成する過程においてペプチドグリカン層を通過する機構を理解する上で重要な知見を得ることができた。よって、本論文は学位に値するものと認める。