

Title	Structure analysis of the flagellar hook-filament junction by electron cryomicroscopy
Author(s)	牧野, 文信
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59344
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"〉 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

氏名	まきのあき 牧野文信
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 25462 号
学位授与年月日	平成24年3月22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	Structure analysis of the flagellar hook-filament junction by electron cryomicroscopy (細菌べん毛フック繊維連結部の極低温電子顕微鏡による構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 難波 啓一 (副査) 教授 近藤 寿人 教授 今田 勝己 教授 中川 敦史

論文内容の要旨

The bacterial flagellum is a biological nanomachine used for bacterial locomotion. The flagellum consists of three functional parts: the basal body, which acts as a rotary motor; the filament, which acts as a helical propeller; and the hook, which acts as a universal joint. The filament is a helical, supercoiled assembly of a single protein, FliC, and is formed by 11 protofilaments. For bacterial taxis, the reversal of motor rotation switches the supercoil between left- and right-handed helices, both of which arise from combinations of two distinct conformations and packing interactions of the L-type and R-type protofilaments. The hook is made of about 120 copies of a single protein, FlgE, and is a highly curved tube and also flexible in bending. The hook-filament junction is made of two proteins, FlgK and FlgL, which are responsible for connecting these two mechanically distinct structures. The hook-filament junction works not only as a mechanical adaptor but also as a buffer component to avoid transmission of the different conformational changes between filament and hook: polymorphic supercoiling occurs in the filament portion while continuous and dynamic conformational changes occurs in the hook portion in every revolution. To understand how this mechanical adaptor works, I analyzed the structure of the hook-filament junction complex of the L- and R-type straight filaments (L-junction complex and R-junction complex, respectively) by using electron cryomicroscopy (cryoEM).

First I focused on the optimization of sample preparation and image data collection. I used a mutant strain in which the expression level of *fliC* can be controlled by tetracycline to make the filament length relatively short. This made image data collection highly efficient.

Next, I developed a new method of image analysis for the hook-filament junction. The strong feature of the helical symmetry in the filament and the hook portion caused misalignment in conventional two-dimensional alignment procedures. To avoid such a strong influence of the helical lattice on the alignment process, I used one-dimensional projection alignment to determine x- and y-shift and a pseudo-junction complex made of the filament and the hook with imposed helical symmetries as a reference volume to determine the azimuthal orientation. Then, I applied classification and selection procedures to obtain reliable junction structures.

I obtained 3D density maps of the L- and R-junction complexes at 19 Å and 20 Å, respectively. These

maps show the shape and array of subunits in the junction structure. I found a significant difference in the tilt angle of the junction portion between the L- and R-junction complexes. This tilt is in good agreement with the hinge motion of domains D1, D2 and D3 of flagellin against its domain D0 for the overall switching in the orientation of the flagellar protofilament, indicating that the packing arrangement of the FlgK and FlgL subunits are similar to that of flagellin in the filament. The structures lead to the identification of an important FlgL-FlgL interaction that is responsible for the loss of supercoiling by the reversed rotation of the filament in a viscous solution.

論文審査の結果の要旨

細菌の運動器官であるべん毛は、回転モーターの基部体、らせん型プロペラの繊維、両者を連結してユニバーサルジョイントとして働くフックからなります。曲げに対して柔らかいフックと比較的固くてらせん構造を左巻と右巻に切り替える繊維の間には、これら機械的特性の全く異なる二つの構造を連結するアダプター構造が存在します。申請者は、極低温電子顕微鏡の画像解析法を用いてこのフック繊維連結部の構造解析を行ないました。フック繊維連結部は、異なるらせん対称性を有する長い構造体に挟まれた対称性のない複合体であるため、高分解能の画像解析に必要な多数の粒子像を得るのが難しく、しかも周辺構造のらせん対称性による強い周期的画像パターンに影響されて粒子像の整列が難しいといった、画像解析を極めて困難とする特徴がありました。申請者は、フック繊維連結部の極低温電子顕微鏡像の記録に適した試料精製法を確立するとともに、自らのアイデアを基に画像解析法を立案し応用して、きわめて困難であると予想されたフック繊維連結部の構造解析に成功しました。これらの成果は細菌べん毛の機械的な分子メカニズムの解明にとどまりません。開発された画像解析法は、真核細胞の細胞骨格に多く見られる、異なるらせん対称性を持つ繊維が結合した構造体や、繊維の先端にキャップ蛋白質が結合した構造体など、生体内で重要な役割を果たす様々な超分子複合体の構造解析にも応用可能です。以上の通り、申請者の研究は新規性と発展性があり、世界的に認められる成果をあげましたので、学位に値するものと認めます。