



Title	Molecular Mechanisms of FlhA in the Type III Flagellar Protein Export
Author(s)	原, 典孝
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60021
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	原 典 孝
博士の専攻分野の名称	博 士（工学）
学 位 記 番 号	第 2 6 2 7 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 25 年 3 月 25 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	Molecular Mechanisms of FlhA in the Type III Flagellar Protein Export (べん毛Ⅲ型蛋白質輸送における FlhA の分子機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 難波 啓一 (副査) 教 授 谷澤 克行 教 授 四方 哲也 教 授 高木 淳一

論 文 内 容 の 要 旨

The type III flagellar protein export apparatus is a bacterial membrane-embedded nanomachine, which exports the flagellar proteins from the cytoplasm. To export the protein subunits across the membrane, the export gate complex composed of six transmembrane proteins (FlhA, FlhB, FliO, FljP, FliQ, FliR) utilizes proton motive force (PMF) as an essential energy source for unfolding/translocating work, but the molecular mechanism remains poorly understood.

This thesis describes functional analysis of FlhA, which is the most conserved membrane component in the export gate complex. Genetic characterization of conserved charged residues of transmembrane domain of FlhA (FlhA_{TM}) showed that only Asp208 is an essential protonatable residue and most of substitutions are tolerated by the presence of FliH-FliI ATPase complex. Analysis of the interaction mode of FliH suggested that the interaction of FliH with FlhA is required for anchoring FliI hexamer ring to the export gate for efficient and robust protein export. Intracellular pH measurement showed that D208A mutation significantly increase the proton conductivity of FlhA, indicating that Asp208 may not form proton pathway, but play an important role for the energy coupling process. Surprisingly, FlhA also shows sodium ion conductivity, suggesting that FlhA may act as a hybrid energy transducer for the protein export. Since cytoplasmic domain of FlhA (FlhA_C) interacts with substrates and is also involved in its translocation, ions flux through FlhA_{TM} might couple with conformational change of FlhA_C.

Overall experiments were inspired by the similarities between the type III protein export apparatus and

FOF1-ATP synthase and designed to reveal shared mechanism and discrepancy. These experimental approaches

could uncover a common mechanism and provide an insight how nature has evolved a wide variety of nanomachines from relatively small number of common ancestors.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は、サルモネラ菌のべん毛Ⅲ型蛋白質輸送装置の分子機構の解明を目指し、輸送ゲートを構成する膜蛋白質FlhAの遺伝学的・生化学的機能解析を行った。

申請者はまず、FlhAの膜貫通領域に保存された荷電残基の遺伝学的解析を行い、輸送機能に必須のAsp208を同定し、さらにFlhAの機能発現にはFliH-FliIが重要であることを見出した。この結果からFliH-輸送ゲート間の相互作用様式に注目した申請者は、FliHのN末端が結合する因子を部位特異的光架橋法により探索し、FlhAであることを示した。またこの相互作用はATPase FliIの輸送ゲートへの効果的な結合に重要であることが示唆され、申請者はATP合成酵素の外周固定子とFliHの機能的類似性を提案した。この仮説に基づき、FlhAがプロトン透過経路を形成すると予想した申請者は、細胞内pHを測定することで、間接的にFlhAのプロトン透過能を検証した。その結果、FlhA発現により細胞内pHが有意に低下し、FlhAがプロトン透過能を有することが示唆された。またFlhAのイオン選択性を評価する目的で、細胞内ナトリウムイオン濃度変化を測定したところ、FlhAがナトリウムイオン透過能も有することが示唆された。これらの結果から、申請者はFlhAが輸送装置における2系統エネルギー変換装置ではないかと提案した。

以上の結果は、今まで手付かずであった輸送ゲート構成膜蛋白質FlhAの分子機構に関する知見を広げ、進化的に関係していることが示唆されたATP合成酵素と輸送装置の機能類似性も示したものである。ただ、FlhAの2系統エネルギー変換装置の仮説については、今後より精密な実験により注意深く検証する必要がある。

以上のとおり、申請者やⅢ型蛋白質輸送の機能解明において高い成果をあげており、博士の学位に値するものと認める。