

細菌べん毛モーターエネルギー変換タンパク質の構造と機能

寺内 堯史, 小嶋 誠司, 本間 道夫

超分子モーターであるべん毛は、細菌の重要な運動器官であり、細菌自身が好む環境へ移動するのに用いられる。べん毛モーターの回転力は、プロトンもしくはナトリウムイオンの流入と共役し、そのイオン流のエネルギーを機械的な回転力に変換することで産生されている。筆者らは、この回転力産生の機構を明らかにするために、ビブリオ菌のナトリウムイオン駆動型べん毛モーターを対象に研究を進めている。最近になって、ナトリウムイオンのモータータンパク質への結合の実測やイオン透過経路の解明に大きな進展が見られた。また、モータータンパク質の結晶構造が、部分的ではあるが解明された。当研究室の研究結果を中心に、最新のべん毛モーターのエネルギー変換機構について紹介する。

1. はじめに

多くの細菌はべん毛と呼ばれる運動器官を持ち、液体中を泳ぎ回ったり、固体表面を移動したりする。細菌のべん毛は、菌体表面から生えているらせん状の繊維であり、細菌はこのらせん状繊維の根元にあるモーターによってスクリューのように回転させ推進力を生み出している。べん毛は細菌の種により本数や形態が様々である。大腸菌、サルモネラ菌、枯草菌などは周毛性であり、菌体の周囲に複数のべん毛を持つ。これらのべん毛は遊泳時には束を形成し推進力を発生する。これに対して、多くのビブリオ属細菌やコーロバクター属細菌および緑膿菌などは極毛性の単べん毛を持つ。ランダムに生える周毛性べん毛から、極という特定の位置にべん毛を作るように進化したのではないかと考えられるが、定かな証拠はない。べん毛を回転させる駆動力は共役イオンの膜内外の電気化学ポテンシャル差で、そのべん毛繊維を機械的に回転させることで、推進力が作り出されている。共役イオンとして大腸菌やサルモネ

ラ菌ではプロトンが用いられ、海洋性ビブリオ菌の極毛ではナトリウムイオンが用いられることが分かっている^{1,2)}。

2. べん毛構造と構造形成

2-1. 基本構造と構成タンパク質

べん毛は30種類以上のコンポーネントによって構築される。べん毛は、細胞外に長く伸びたらせん状繊維であるフィラメント、自在継ぎ手として機能するフック、膜表面に埋まった基部体で構成される。基部体は外膜 (L) およびペプチドグリカン層 (P) に結合するLPリング (グラム陽性菌は持たない)、内膜に結合するMSリング、そして、それらをつなぐロッドから構成される³⁾。基部体の周辺には共役イオンの流入を利用してべん毛回転を駆動するMotA, MotB (PomA, PomB) という2種のタンパク質から構成される固定子複合体があり、二枚のリングからできているように見えるが実は一種類のタンパク質FliFにより構成されているMSリングの下(細胞内)には、モーターの回転方向を制御するCリングが付着している⁴⁾(図1)。CリングはFliG, FliM, FliNという3種のタンパク質から構成され、MSリングとはFliGを介してつながっていて、FliGもまたリングを形成していると考えられている^{5,6)}。また、FliGとMotA (PomA)の間には相互作用が存在し、それによってトルク(回転力)が発生していると考えられている⁷⁻¹⁰⁾。海洋性ビブリオ菌 (*Vibrio alginolyticus*) や腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) のナトリウムイオン駆動型べん毛モーターでは、大腸菌などには存在し

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 (〒464-8602 名古屋市千種区不老町)

Structure and function of energy transduction protein complex of bacterial flagellar motor

Takashi Terauchi, Seiji Kojima, and Michio Homma (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan)

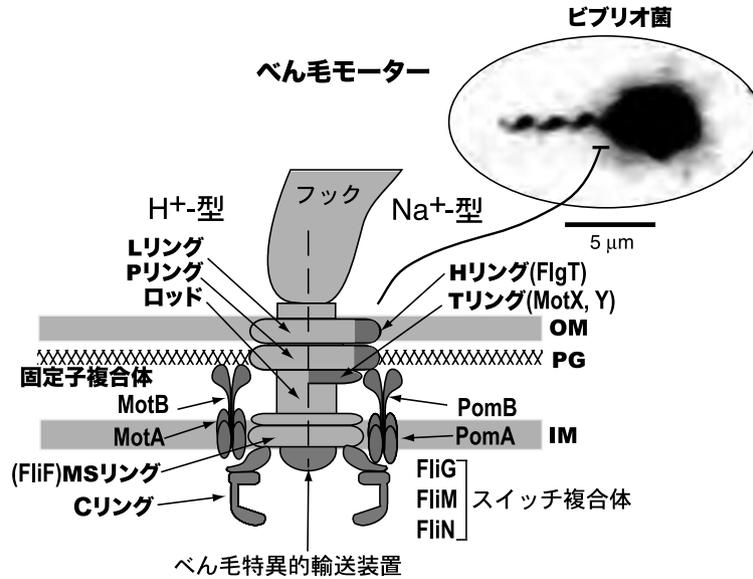


図1 べん毛基部体とモーター複合体部分を含めたべん毛構造全体のモデル図

左半分がプロトン駆動型，右半分がナトリウムイオン駆動型のモーターを示す。ナトリウムイオン駆動型のモーターにはプロトン駆動型では見られないTリングやHリング構造が存在する。OM；外膜，PG；ペプチドグリカン，IM；内膜。

ない MotX, MotY が存在し，LP リングの下に T リングという構造体を形成していること¹¹⁻¹³⁾，また，LP リングの外側に FlgT で構成される H リングという構造があることが，ごく最近，明らかになっている (図 1)¹⁴⁾。

2-2. べん毛構造形成過程

べん毛形成については，サルモネラ菌でもっとも研究が進んでいる。べん毛の部品は，基本的にはべん毛構造の根元から先端に向けて作られていく。まず始めに，FliF からなる MS リングが膜に埋め込まれて構造形成が開始されると考えられている。次に，MS リングの下に FliG, FliM, FliN で構成される C リングが形成される^{15,16)}。べん毛構造の大部分は細胞膜より外側に位置しているので多くの部品は細胞膜を透過しなくてはならない。べん毛構造を構成するタンパク質のほとんどは，Sec 系膜透過装置により認識されるシグナルペプチドを持たず，べん毛特異的なチャネルによって運ばれる^{17,18)}。べん毛繊維やフックの中心部にある中空構造がそのチャネルであるといわれている。チャネルの入り口にはべん毛タンパク質を特異的に選択し，輸送するべん毛輸送装置があることが示されている¹⁹⁾。基部体の構成タンパク質の同定とそれらの構成タンパク質の存在量比の決定が行われて，サルモネラ菌では 7 種類のタンパク質 (FlgBC, FlgFGHI, FliF) が 130 個くらい集合し，構築された超分子複合体であることが示されている^{15,20,21)}。MS リングは FliF, L リングは FlgH, P リングは FlgI, ロッドは基部に近い部分と遠い部分に分けて構築され，近い部分は FlgB, FlgC, FlgF, 遠い部分は FlgG で構成され

ている²²⁻²⁶⁾。基部体はロッドの中心を軸とした回転対称形である。ロッドの中心は中空になっていて，このチューブを通してべん毛構成タンパク質の輸送が行われる。LP リングの構成タンパク質である FlgH や FlgI は，N 末端にシグナルペプチドを持ち Sec 系膜透過装置で菌体外に輸送される。最近になって，我々は FlgI の機能に必須だと考えられていたジスルフィド結合が²⁶⁾，むしろタンパク質の安定性に重要であることを示した²⁷⁾。ビブリオ菌で報告されたナトリウムイオン駆動モーター特異的タンパク質である MotX, MotY も，Sec 輸送シグナル配列を持つことが示されている²⁸⁾。MotXY で構成される T リングは，基部体の電子顕微鏡像から，おそらくリング状かあるいはスカート状の構造が形成されていると考えられる^{13,29)}。また，変異体の基部体の観察から，MotY が基部体のおそらく P リングに結合し，MotX はそれを土台として結合し，T リング構造が完成すると考えられている。FlgT で構成される H リングは LP リングの外側にあるということのみ明らかになっている¹⁴⁾。現在のところ，MotY³⁰⁾ と FlgT (投稿準備中) の結晶構造は得られているものの，基部体モーター構造における T リング，H リングの構成タンパク質の存在量比や詳細な三次元再構成像は示されていない。

2-3. べん毛形成と遺伝子発現制御

べん毛遺伝子の発現は，その構造形成と共役している。すなわち，基部体とフックの構造が完全にできあがるまではべん毛繊維形成や，モータータンパク質，化学感覚受容体やシグナル伝達に関する遺伝子の発現は起こらない。こ

れは、べん毛遺伝子の発現が厳密な階層構造を持つことによる。サルモネラ菌や大腸菌においては、約50個の遺伝子が17のオペロンを形成し、三つのクラスに分けられて発現制御されている(図2A)³¹⁾。マスターオペロンに属する遺伝子によりコードされる FlhD, FlhC はクラス II に属するオペロンを活性化することにより全てのべん毛遺伝

子を最上位で支配する³²⁾。次にクラス II に属するべん毛特異的な σ 因子 σ^{28} (*fliA*) が下位クラスあるいは同じクラスに属する他のオペロンの発現を正に調節する。クラス II には基部体やフックの形成に関与する遺伝子群が属している。クラス III にはべん毛繊維を形成するフラジェリンを含めべん毛形成の最終段階である繊維形成に関与する遺伝

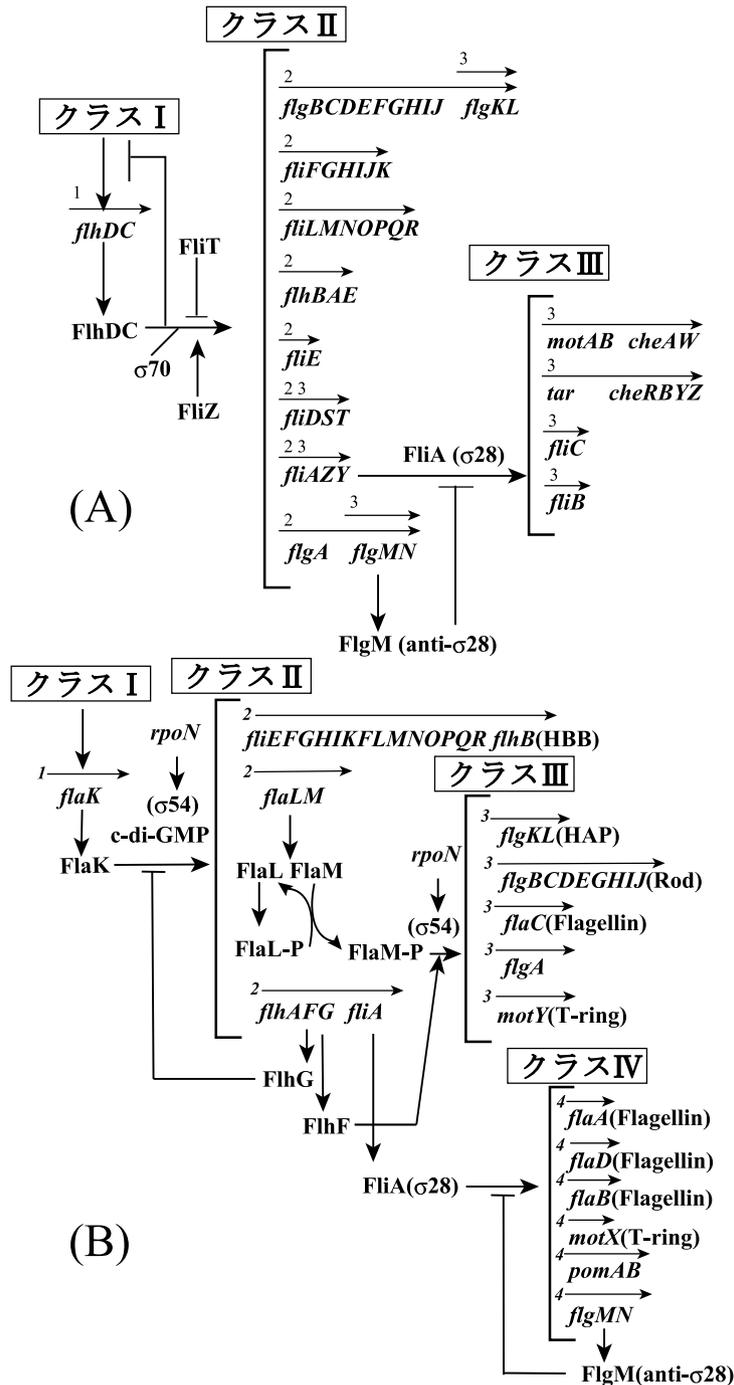


図2 べん毛遺伝子発現の制御モデル

(A) 大腸菌・サルモネラ菌¹⁰⁹⁾と (B) 海洋性ビブリオ菌³⁶⁾のモデルを示した。矢印の上の番号が転写階層のクラスを示す。

子群や完成したべん毛の機能に関与する遺伝子群が属している。クラス III に属する *flgM* は、クラス II 遺伝子の下流にあるためクラス II プロモーターからも転写を受け、*fliA* のアンチシグマ因子として働き、クラス III 遺伝子群の発現を負に制御する。フックが完成すると、FlgM はフックおよび基部体構造の中を通過して菌体外に排出され、その結果細胞内の FlgM 濃度が減少し、FliA が活性化されてクラス III の発現が開始されると考えられている³³⁻³⁵。

海洋性ビブリオ菌や、コレラ菌、緑膿菌は極に 1 本のべん毛を持ち、べん毛の形成位置や本数制御において、それら細菌が類似の制御機構を持つことが報告されている。 *V. parahaemolyticus* や *V. cholerae* との遺伝子の類似性から、 *V. alginolyticus* のべん毛遺伝子発現制御が推測されている (図 2B)³⁶。べん毛の数や位置を制御するのは非常に重要なことである。べん毛の形成位置と本数に関する研究はシュードモナス属で始まった。シュードモナスでは FliH がべん毛形成位置決定に関与し、FliN がべん毛の本数制御に関わっていることが報告され、FliH 欠損株は極以外にもべん毛を形成すること、FliN 欠損株は多数のべん毛を持つことが報告されている^{37,38}。また、海洋性ビブリオ菌においても、FliH と FliG (FliN) についての研究が行われ、当研究室において、海洋性ビブリオ菌の *fliH* 欠損株は極べん毛を持たず、*fliG* 欠損株は極に多数のべん毛を持つことが示された³⁹。また、FliH を大量発現させると極べん毛の数が増え、FliG を大量発現させるとべん毛の数が減るということも明らかになった。さらに、FliH の GTP 結合ドメインがべん毛の位置制御に重要であることが示唆されている。このことから、シュードモナス属と同様に海洋性ビブリオ菌においても、FliH はべん毛の位置を制御しており、FliG がべん毛の数を制御していると考えられている^{40,41}。さらに、FliH と FliG が欠損した株から、べん毛が周毛性になっている運動能の回復した抑圧変異体が得られた³⁶。極毛性の菌を周毛性に変換できたことになり、この変異体ではべん毛形成開始が菌体のどこにでも起こることができるようになったと考えられる。この抑圧変異が同定されて機能が分かれば、べん毛形成開始機構が明らかになるかもしれない。

3. スイッチ複合体と C リング構造

スイッチ複合体は、べん毛モーターのトルク産生、回転方向のスイッチ、べん毛形成に関与する複合体で、FliG, FliM, FliN の 3 種類のタンパク質で構成されている (図 1)。これらの完全欠損株ではべん毛が形成されないが、変異部位によって Fla⁻ (べん毛形成欠損)、Mot⁻ (べん毛モーター回転欠損)、Che⁻ (走化性欠損) の表現型を示す⁴²。FliG は、特にトルク発生において重要と考えられている⁷。このスイッチ複合体は、電子顕微鏡で観察したとき

にべん毛基部体の MS リングの下部にリング構造をとっていることから、C リングとも呼ばれる。プロトン駆動型べん毛モーターでは、サルモネラ菌において電子顕微鏡を用いた構造解析により、この C リング付きの基部体の三次元構造が明らかになっている⁴³。現在のところ電子顕微鏡で構造が確認できている C リングの大部分が FliM と FliN であり⁴³、MS リングと C リングをつなぐ領域で FliG がリングを形成していると考えられている⁴⁴。

超好熱性真正細菌 *Thermotoga maritima* において FliG^{45,46}、FliM⁴⁷、FliN⁴⁸ のフラグメントの結晶構造解析が、また、最近になって超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* において FliG の全長の結晶構造解析が行われ⁴⁹、スイッチ複合体を構成するタンパク質のそれぞれの機能に重要と思われる特徴が明らかになった。この論文でダイナミックな動きをする時計回りと反時計回りの状態の FliG 構造を推測しているが、これが真実であるかは検証の必要がある。サルモネラ菌のべん毛モーターにおいて、構成タンパク質の存在量比は FliG が 26 個、FliM が 34 個、FliN が 100 個以上であると考えられている^{5,49-51}。しかし、C リングの詳細な回転対称性解析から、FliG の作るリングは 25 回の回転対称であるという報告もある⁵²。一方、ナトリウムイオン駆動型べん毛モーターでは、C リングがついた状態の基部体の精製すら行われておらず、電子顕微鏡像も得られていなかった。しかし、最近になって海洋性ビブリオ菌において、FliG が MS リングに結合した状態の基部体の電子顕微鏡像が得られ、ナトリウムイオン駆動型べん毛モーターの構造も明らかになりつつある⁵³。

4. モーター複合体

トルク発生ユニットとして働く MotA/B 複合体あるいは PomA/B 複合体は膜上に存在し、べん毛基部体の周りに集合している。MotA/B 複合体は大腸菌やサルモネラのプロトン駆動型べん毛モーターのトルク発生ユニットであり、PomA/B 複合体はビブリオ菌などのナトリウムイオン駆動型べん毛モーターのトルク発生ユニットで、MotA/B のオルソログである⁵⁴⁻⁵⁶。 *V. alginolyticus* ではプロトン駆動型の MotA/B オルソログが存在していたため、区別するためにあえて Pom (Polar flagellar motility) という名前を筆者らがつけた。その PomA/PomB (MotA/MotB) は膜タンパク質で、A₂B₂ のヘテロ六量体を形成している⁵⁷⁻⁵⁹。精製した PomA/B 複合体をリポソームに再構成し、カリウムイオンの拡散膜電位を形成させると、プロテオリポソーム内にナトリウムイオンを取り込むことから、PomA/B 複合体がナトリウムイオン透過活性を持つことが示された⁶⁰。PomA (MotA) は 4 回膜貫通領域を持ち、2 番目と 3 番目の膜貫通領域間に大きな細胞質ループ領域が存在する^{56,61}。PomB (MotB) は N 末端に 1 回膜貫通領域

を持ち、残りの大部分がペリプラズム空間に存在している。このペリプラズム領域には、ペプチドグリカン結合モチーフが存在し、PomA/B (MotA/B) 複合体をペプチドグリカン層にアンカーしていると考えられている。また、少なくとも 11 個以上の PomA/B (MotA/B) 複合体が回転子の周りを取り囲むように存在していると考えられている^{62,63}。大腸菌の MotB のペプチドグリカン結合ドメインは、外膜の安定性や輸送にかかわる Tol-Pal システムに属する Pal のペプチドグリカン結合ドメインと交換しても機能することが報告されている⁶⁴。サルモネラ菌の MotB では、ペリプラズム領域とペプチドグリカン結合モチーフを含む C 末領域の結晶構造が得られており、MotB が 2 量体を形成することや、プロトンの流入とともにこの領域がダイナミックに構造変化することが推察されている (図 3 参照)⁶⁵。PomB においても同様な領域の結晶化に成功している (投稿準備中)。

共役イオンは PomA/B (MotA/B) 複合体が形成するイオンチャネルを通り、細胞内に流入すると考えられている。流入と共役して PomA (MotA) の細胞質ループ領域と回転子コンポーネントの FliG との間に何らかの相互作用が起こり、イオンの流入エネルギーが回転力に変換されると考えられている^{9,10,66-68}。ピブリオ菌ナトリウムイオン駆動モーターの PomA/B 複合体の機能には MotX/Y が必要であり、特に MotX が PomB と相互作用すると考えられている⁶⁹。MotY は結晶構造が解かれて、N 末端と C 末端の二つのドメインからなり、N 末端ドメインは新規の構造

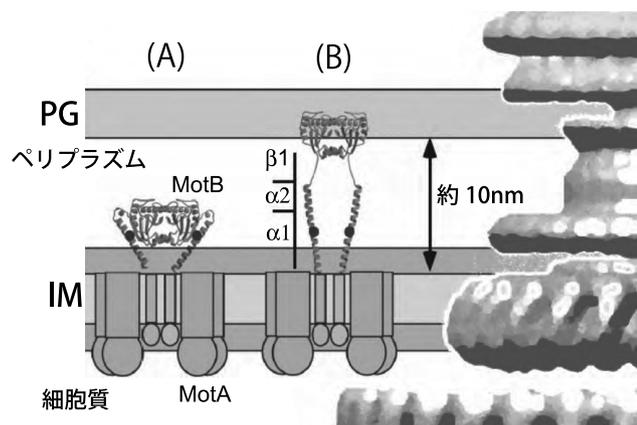


図 3 プロトン駆動型固定子タンパク質 MotB の構造変化
サルモネラ菌 MotB のペリプラズム領域とペプチドグリカン結合モチーフを含む C 末領域の結晶構造から推察されるプロトンの流入に伴うダイナミックな構造変化のモデルを示す⁶⁵。(A) 結晶構造解析から得られた不活性化状態と推測される構造。MotB の C 末端は折り畳まれており、ペプチドグリカン層には結合していない。(B) イオンが固定子複合体と相互作用し、活性化状態になったと推定される構造。折り畳まれていた部分が伸びることでペプチドグリカン結合ドメインがペプチドグリカン層に達し、アンカーされる。PG; ペプチドグリカン, IM; 内膜。

を示したが、C 末端は推定ペプチドグリカン結合モチーフを含み、その構造は Pal や RmpM といった PG 結合タンパク質および MotB と非常によく似ていることがわかった。N 末端は固定子の回転子周囲への集合に必要であり、C 末端ドメインはペプチドグリカンに結合することで、固定子-回転子間相互作用を安定化していると考えられた³⁰。MotX, MotY から構成される T リングは、PomA/B 複合体が基部体の周囲に集合して、機能的なモーターとなるために必要な構造体であると推測されている。

5. イオン結合部位とイオン透過経路

MotA/B 複合体では、詳細なシステイン架橋実験が行われており、イオンの透過経路は、MotA の 3 番目と 4 番目の膜貫通領域と MotB の膜貫通領域で形成されていると考えられている^{59,70,71}。PomA/B 複合体では、PomA の第 3 膜貫通領域にある D148 や、PomB の膜貫通領域にある P16 に変異を導入すると、ナトリウムイオン駆動型べん毛モーターのチャネルポアに蓋をするように作用すると考えられる特異的阻害剤フェナミルに耐性を示すようになることが報告されている⁷²⁻⁷⁵。PomA-D148 と PomB-P16 はシステインに置換すると架橋がかかる⁷⁶。このことから、PomA/B 複合体も MotA/B 複合体と同様に、PomA の 3 番目と 4 番目の膜貫通領域と PomB の膜貫通領域でイオン透過経路を形成していると考えられている。また、PomA の 3 番目と 4 番目の膜貫通領域間のペリプラズム側ループに存在する P172 をシステインに置換して架橋実験を行うと、二量体を形成することから、PomA 同士は隣り合って存在していることが推定されている⁷⁷。大腸菌の結果も考慮して、現在、推測されるナトリウムイオン駆動型べん毛モーター膜タンパク質の膜貫通部分の配置を図 4A に示す。

PomB (MotB) の膜貫通領域にはモーターの回転に必要なアスパラギン酸残基が存在し、ここが共役イオンの結合部位であると推測されている⁷⁸。このアスパラギン酸残基は MotB ホモログ中で完全に保存されている。アスパラギン酸からグルタミン酸を除く他のアミノ酸に置換すると、完全に運動能が失われる。大腸菌では、グルタミン酸に置換したときのみ、わずかに運動能を保持していることが示されている⁷⁸。最近、PomB-D24 をアスパラギンに置換した変異体 PomB-D24N は完全に運動能を失うが、PomA の 4 番目の膜貫通領域に存在する保存性の高い親水性残基、PomA-N194 と PomB-D24 のアミノ酸残基を入れ替えた PomA-N194D/PomB-D24N 二重変異体はわずかに運動能を示すことが明らかになった⁷⁹。このことから、PomA-N194 と PomB-D24 は近い位置でイオン透過経路に面していて、ナトリウムイオンが結合するためのポケットのようなものを形成していることが示唆された。また、当研究室において、全反射吸収赤外分光法 (ATR-FTIR) を用いて、PomB

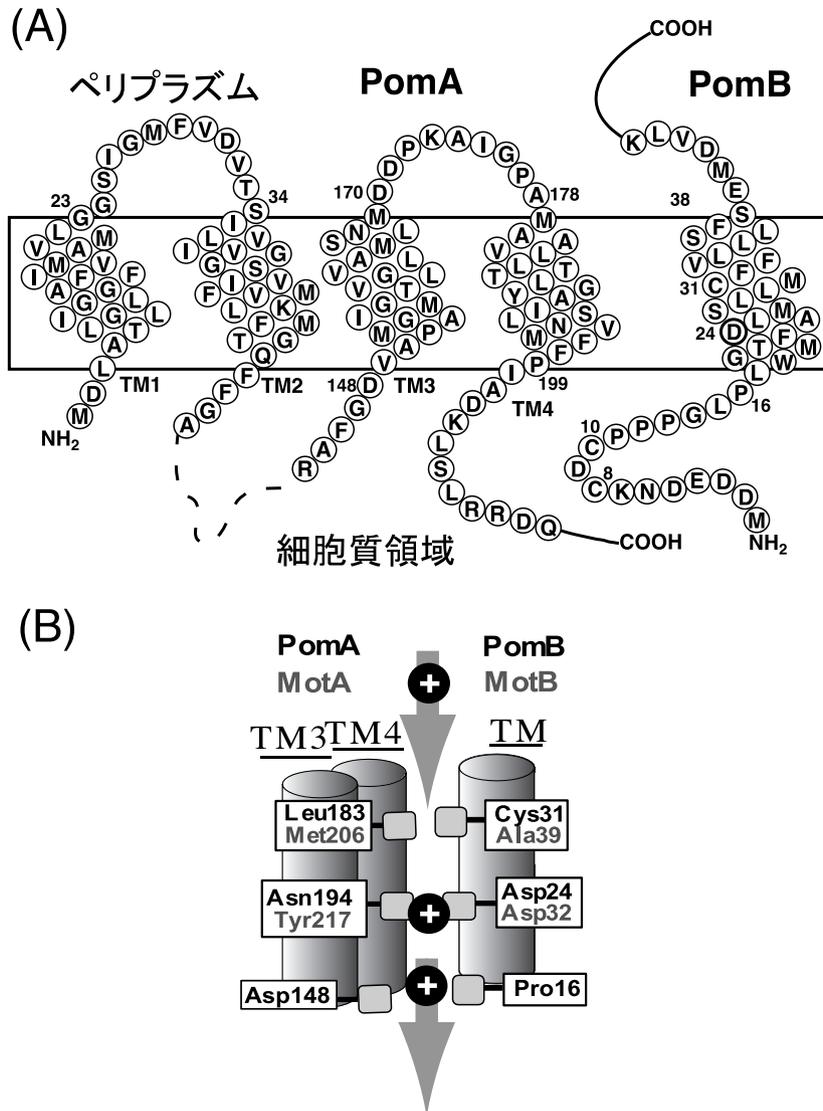


図4 ベン毛モータータンパク質の推定膜貫通部位とイオン透過部位
 (A) ナトリウムイオン駆動型ベン毛モーター膜タンパク質 PomA と PomB の膜貫通部分の推定される配置. (B) ナトリウムイオン駆動型の *V. alginolyticus* とプロトン駆動型の *E. coli* 由来の固定子複合体のイオン透過経路を形成していると考えられているアミノ酸残基の位置を示したモデル図⁸²⁾. 白抜きのは、ナトリウムイオンあるいはプロトンを示す.

の保存されたアスパラギン酸残基 (PomB-D24) にナトリウムイオンが結合することが初めて直接的に示され、共役イオンの結合サイトであることが証明された⁸⁰⁾. さらに、PomB-D24 以外に二つ、ナトリウムイオンが相互作用できるカルボキシル基があることが示唆されており、その位置は、ペリプラズム側に一つ、細胞質側に一つあると考えられている。

イオン透過についてもいろいろなことが明らかになっている。PomA-D31 をシステインに置換すると、ナトリウムイオンが低濃度では運動することができず、ナトリウムイオンが 38 mM を超えると動きだす⁸¹⁾. このことから、

PomA-D31 はペリプラズム側に位置し、ナトリウムイオンの透過効率を高めているのではないかと推察されている。特にこれは先に述べたペリプラズム側でナトリウムイオンに相互作用するカルボキシル基にあたるのではないかと考えられる。また、MotB-A39V 変異により側鎖が大きくなることで発生した運動能の低下が、MotA-M206S 変異により MotA 側の側鎖が小さくなることで回復することや PomB-L28A/C31A 変異による運動能の低下が PomA-L183F 変異で回復することから、MotA/B 複合体では MotA-M206 と MotB-A39 がイオン透過経路の一部とポアを形成し、PomA/B 複合体では、PomA-L183 と PomB-C31 がイ

オン透過経路の一部とポアを形成していると示唆されている⁸²。ナトリウムイオン駆動型べん毛モーター PomA/B 複合体において、詳細なイオン透過経路は明らかにはなっていないが、そのイオン透過に関与するアミノ酸残基を明らかにすることができたという大きな進展があった(図 4B)。

6. べん毛モーター固定子のイオン特異性

先にも述べたように、べん毛モーターは、べん毛駆動に用いるイオンの違いから 2 種類に分類される。大腸菌やサルモネラ菌、ロドバクター、シュードモナスなど多くの細菌はプロトン駆動型モーターを、一方、ビブリオ菌や好アルカリ性バチルス、コレラ菌などの細菌はナトリウムイオン駆動型モーターを持っている^{1,83-85}。また、ビブリオ菌のべん毛モーターはナトリウムイオンより効率は悪いが、共役イオンとしてリチウムイオンも使うことができる。ビブリオ菌は海洋に生息する細菌であるため、海洋でより利用しやすいナトリウムイオン流を駆動力として回転するモーターを作り上げたと思われる。では、それぞれの固定子でイオンの特異性を決めている領域はいったいどこなのだろうか。*Rhodobacter sphaeroides* の MotAB (Rs-MotAB) は、プロトン型の固定子だが、ナトリウムイオン型の *Vibrio alginolyticus* PomAB (Va-PomAB) と 40% を超える同一性を持っている。PomA を欠損したビブリオ菌に Rs-motA を発現させるとナトリウムイオン駆動力で遊泳することから、固定子のイオン特異性は B サブユニットに依存していると示唆された⁸⁶。そこで、Rs-MotB の N 末端と Va-PomB の C 末端とで構成されるキメラタンパク質 MomB が作成され、それを発現するビブリオ菌の遊泳能が調べられた⁸⁷。B サブユニットの膜貫通領域の後半 (PomB の F33 と V34 の間) で連結した MomB5 と Va-PomA を共発現させると、ナトリウムイオン存在下での遊泳速度が大きく低下したが、リチウムイオン存在下での遊泳能はあまり低下せず、ナトリウムイオンよりリチウムイオンでより早く遊泳した。また、B サブユニットの膜貫通領域の前半 (PomB の F22 と A23 の間) で連結した MomB6 は、ナトリウムイオン存在下での遊泳速度は変化しないが、リチウムイオン存在下での遊泳能は大きく低下した。これらのことから、おそらく固定子の構造変化によりチャネルポアの大きさが変化し、透過できるイオンサイズの選択性が変化したと考えられている。そして、B サブユニットのみがイオン特異性を決めているのではないと推測できた。大腸菌の MotB (Ec-MotB) とビブリオ菌の PomB からなるキメラタンパク質 PotB は pomB を欠損したビブリオ菌の運動を回復することができる。Va-PomB の N 末端から膜貫通領域までと Ec-MotB のペリプラズム領域からなるキメラ PotB7^E は、ビブリオ菌の運動に必須な固定子タンパク質 MotX, MotY 欠損下でも PomA と一緒に発現

させるとナトリウムイオン駆動型固定子として機能する。このキメラは、大腸菌の中でも、ナトリウムイオン駆動型固定子として機能する⁸⁸。従って、PomB のナトリウムイオン選択性に PomB のペリプラズム領域は必要でないことになる。一方で、Ec-MotB の N 末端から膜貫通領域までと Va-PomB のペリプラズム領域からなるキメラ MomB7E は、MotX, MotY を必要とするが MotA と一緒に発現させるとナトリウムイオン駆動型固定子として機能する。PotB7^E の結果と矛盾するように思えるが、MotAMomB7E は MotX, MotY を必要とするため、MotX, MotY が MomB7^E の PomB ペリプラズム領域に作用し、MomB7E の共役イオンがナトリウムイオンになると考えている⁸⁸。べん毛の駆動に用いられるイオンの特異性がどのように決まっているのかを詳細に理解するためにはさらなる解析が必要であり、べん毛モーター固定子の結晶構造解析の進展が期待される。

7. べん毛モーター固定子の動的集合

べん毛モーターに集合する固定子の数は、固定子タンパク質の発現に伴う段階的なべん毛の回転速度の上昇と GFP-MotB の段階的な蛍光退色を用いた固定子の数の測定から、少なくとも 11 個の固定子が存在していることが示唆されている^{62,63}。また、細胞膜のレプリカ法による電子顕微鏡観察から、べん毛と思われるリング構造の周りに 10-12 個の粒子構造が観察された⁸⁹。これらの粒子構造は MotA/B 固定子欠損株では見られないため、固定子であると考えられている。

クライオトモグラフィー電子顕微鏡による菌体細胞再構成像から、べん毛モーター固定子と思われる構造体が、*Treponema* 属細菌からではあるが、16 回対称性を持っていることが報告されている⁹⁰。また、リボソームに再構成した PomA/B のクライオ電子顕微鏡での観察結果からは、ロッドのような構造体が脂質膜の両側から突き出していることが分かっている⁹¹。この突き出したドメインは直径 20 Å, 長い方のロッドが 70Å, 短い方が 35Å 位であった。ペプチドグリカン結合モチーフを欠失した PomB と金標識の結果から、長い方のドメインがペプチドグリカン結合モチーフを持つ C 末端ドメインであることが明らかになった。しかし解像度が低く、立体構造の決定には至っていない。

GFP を融合させた MotB を用いた FLIP/FRAP 解析により、驚くべきことに固定子はモーターの回転子の周りにずっと固定されているわけではなく、ダイナミックに入れ替わっていることが分かってきた⁶²。この結果は、従来の固定子の静的なイメージを大きく覆すものであり、固定子のモーターへの集合・固定のメカニズムをより動的な変化のもとに考えなければならないことを示している。また、

基部体のPリングを構成しているFliGがMotBと直接相互作用していることが示唆されていることから、固定子が基部体に集合するためにその相互作用が必要ではないかと推測されている⁹²⁾。

PomA/B複合体もダイナミックに入れ替わっているのかを調べるために、ビブリオ菌の固定子にGFPを融合したタンパク質GFP-PomA, GFP-PomBが作成され調べられた。GFP融合固定子複合体は極べん毛基部に集合し、蛍光ドットとして観察されることや、集合にはパートナーとなる固定子タンパク質と回転子の存在が必要であることが明らかになった^{13,93)}。また、様々なナトリウムイオン濃度の懸濁液中で観察を行った結果、GFP融合固定子タンパク質がナトリウムイオン濃度に依存してべん毛モーターに集合していることが実証された⁹⁴⁾。さらに、固定子内でナトリウムイオンの結合部位と考えられているPomBのAsp24残基をAsn残基に置換すると、GFP融合固定子タンパク質の局在とPomA/PomBの固定子複合体の形成の両方に影響が見られ、ナトリウムイオン流入阻害剤であるフェナミルによってもGFP融合固定子タンパク質のモーターへの集合率が減少する。これらの結果から、ナトリウムイオンが固定子内に結合または流入することが、固定子のモーター内への集合に重要であることが示唆された。これに関して固定子複合体がナトリウムイオンと結合することで回転子との相互作用が可能な構造に変化し、モーター内に組み込まれるというモデルが提案されている(図5)。そこで回転子側の変異により、集合が影響されるかどうか調べられた⁹⁵⁾。その結果、Mot⁻表現型を与えるFliG変異体において、固定子の集合が起こらなくなることが観察された。これは、FliGとMotAとの相互作用があることを示すものであり、その相互作用によって固定子が構造変化を起こし、べん毛基部体周囲に固定できるようになると推測された。

8. べん毛モーターのトルク産生

トルク産生にはPomA (MotA)の細胞質ループ領域と回転子コンポーネントのFliGの相互作用が重要であると考えられている。特に大腸菌において、MotAの2番目と3番目の膜貫通ドメイン間の細胞質ループ上にあるR90, E98と、回転子タンパク質FliGのC末端領域にあるK264, R281, D288, D289, R297の間の静電相互作用がトルク産生に重要だと考えられている^{9,66)}。また、これらの荷電残基は、ビブリオ菌のPomAとFliGにも保存されている(PomA R88, E96; FliG K284, R301, D308, D309, R317)。このことからビブリオ菌のべん毛モーターでもこれらの残基の静電相互作用がモーターの回転に重要なのではないかと考えられた。しかし、PomAのR88, E96とその近辺にある三つの荷電残基の計5残基を中性になるよう

に置換してもビブリオ菌は運動することができた⁶⁷⁾。また、FliG欠損株にFliGの電荷を反転させた一残基置換変異体(K284E, R301D, D308K, D309K, R317D)を発現させた場合、大腸菌同様に運動能に影響が出たのはR317Dのみで、K284E, R301Dについては多少運動能が低下したが大腸菌ほどではなく、D308K, D309Kについては、運動能はほとんど低下しなかった⁹⁶⁾。その後、大腸菌でFliG^{EV}(大腸菌FliGのN末端領域とビブリオ菌FliGのC末端領域を持つキメラタンパク質)、PomA, PotB (PomBのN末端領域とMotBのC末端領域を持つキメラタンパク質)を発現させてナトリウムイオン駆動型ハイブリッドモーターを作成し、FliG^{EV}, PomAの荷電残基の二重変異体を用いてPomA-FliG間の静電相互作用が調べられた。その結果、二重変異体において大腸菌の場合と似た相乗効果や抑圧効果のパターンが得られ、ビブリオ菌の極べん毛モーターでも静電相互作用がトルク発生に影響を与えることが示された⁹⁷⁾。ビブリオ菌のべん毛モーターで変異導入の効果が大腸菌よりも弱いのは、大腸菌には無いビブリオ菌ナトリウムイオン駆動モーターに特異的な静電相互作用が、C末端の細胞質領域にあるからではないかと想像されている⁹⁸⁾。

9. べん毛モーターと相互作用する c-di-GMP 結合タンパク質

最近報告された、べん毛モーター回転に関与する新しい因子について触れておきたい。cyclic-di-GMP (c-di-GMP)は*Gluconacetobacter*という細菌のセルロース合成制御因子として同定され、様々なバクテリアのシグナル伝達経路でセカンドメッセンジャーとして使われていることが明らかになった⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。c-di-GMPは病原性との関連も明らかになり、最近の細菌分野における最も大きな発見の一つとして認識されるに至っている。c-di-GMPはPilZドメインを持つタンパク質に結合することで、べん毛や線毛が動かないように調節したり、莢膜やバイオフィルムの形成に必要な線毛構成因子の生合成を促進したりしている^{99,102-104)}。定常状態のc-di-GMPレベルはジグアニル酸シクラーゼ(DGC)とホスホジエステラーゼ(PDE)によって保たれていると考えられている¹⁰⁵⁾。プロトン駆動型べん毛モーターの大腸菌やサルモネラ菌では、YhjHがPDEで、YcgRがc-di-GMPと結合するPilZドメインタンパク質である^{106,107)}。この二つのタンパク質はクラス3のべん毛レギュロンに属し、べん毛形成の制御に関与していることが報告されている¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾。

べん毛モーターの回転制御に関与する因子は、CheYという走化性タンパク質のみであり、CheYがべん毛モーターに結合することで回転の直接的な制御を行っていると考えられていた。ところが最近になって、Cheタンパク質

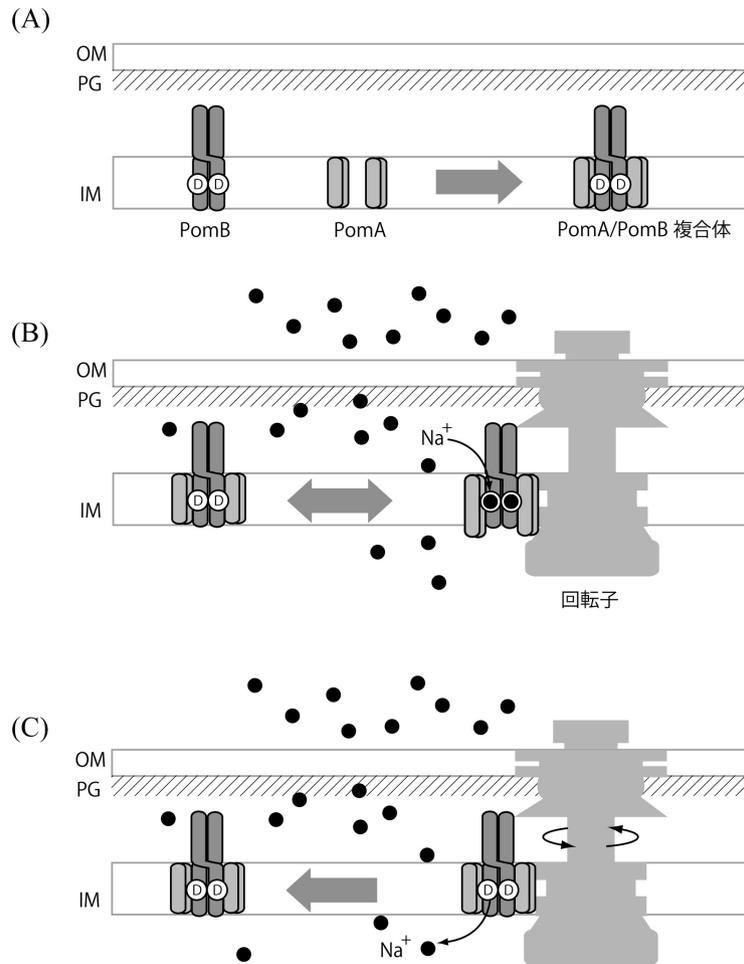


図5 ナトリウムイオン駆動型べん毛固定子複合体のべん毛モーターへの組み込みモデル

固定子複合体がナトリウムイオンと結合することで回転子との相互作用が可能な構造に変化し、モーター内に固定子が組み込まれると考えられている⁹⁴⁾。(A) 固定子タンパク質 PomA と PomB が膜中で複合体を形成する。(B) 環境中のナトリウムイオンにより活性化状態となった固定子が、回転子の周りに集合する。この時、ナトリウムイオンは PomB に保存されているアスパラギン酸残基 (PomB-D24: D) に結合する。(C) 固定子が構造変化し、回転子と相互作用することでトルクが産生される。このステップでナトリウムイオンは PomB-D24 から外れ、細胞質側へリリースされると想像されている。ナトリウムイオンを解離した固定子は回転子の周りから離れていく。OM; 外膜, PG; ペプチドグリカン, IM; 内膜。

以外のバイオフィーム形成に関与するタンパク質がべん毛モーターに直接結合して回転制御しているという知見が得られた¹¹¹⁾。c-di-GMP が大腸菌やサルモネラ菌の運動能を直接的に制御しているということはすでに明らかにされ¹⁰⁴⁾、この制御メカニズムは、YcgR・c-di-GMP 複合体が FliG もしくは MotA と直接的に相互作用することによって、回転のブレーキとして働くことによるものであるということが示された^{112~114)}。Vibrio 属菌でも、特にコレラ菌で c-di-GMP 結合タンパク質の研究は進んでいるが¹⁰¹⁾、ナトリウムイオン駆動型べん毛モーターにおいて YcgR のよ

うな直接的にモーターと相互作用して回転を制御するタンパク質があるのかは明らかになっていない。しかし *V. cholerae* では PilZ ドメインを持ったタンパク質の解析から運動能に影響を与えるものがあることが明らかになっている¹¹⁵⁾。我々は海洋性ビブリオ菌にも YcgR のような機能を持ったモーターと相互作用するタンパク質があると考えており、現在探索を行っている。

10. おわりに

近年、べん毛形成の制御機構や回転メカニズムについて

様々なことが明らかになりつつある。特に最近では、海洋性ビブリオ菌において、べん毛の本数と形成位置の制御に FliH, FliG が重要であることが分かり、また、海洋性ビブリオ菌のナトリウムイオン駆動型べん毛モーターでは、大腸菌などには存在しない Tリングや Hリングという構造が存在することが明らかになった。さらに、全反射吸収赤外分光法 (ATR-FTIR) を用いた解析により、PomB に保存されたアスパラギン酸残基が共役イオンの結合部位であることを直接的に示された。その他、共役イオンの透過経路や、トルク発生時の PomA (MotA) と FliG 間相互作用に関わっているアミノ酸残基が、最近、少しずつではあるが明らかになってきている。

本総説では、エネルギー変換機構以外にも、べん毛の位置決定機構やべん毛モーターの回転を負に制御する cyclic-di-GMP 結合タンパク質に関する知見を紹介した。べん毛モーターに関する研究は様々な視点から行われており、今回紹介したもの以外にも、細菌のべん毛に特異的なタンパク質輸送システムに関する研究や、べん毛の回転ステップに関する研究などが行われている。その他にも今回紹介できなかった点や引用すべき論文もまだまだあるが、お許しいただきたい。この総説がべん毛という超分子ナノモーターに凝縮された生命現象を解明する助けになれば幸いである。

文 献

- Blair, D.F. (2003) *FEBS Lett.*, **545**, 86–95.
- Terashima, H., Kojima, S., & Homma, M. (2008) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **270**, 39–85.
- Aizawa, S., Dean, G.E., Jones, C.J., Macnab, R.M., & Yamaguchi, S. (1985) *J. Bacteriol.*, **161**, 836–849.
- Francis, N.R., Sosinsky, G.E., Thomas, D., & Derosier, D.J. (1994) *J. Mol. Biol.*, **235**, 1261–1270.
- Francis, N.R., Irikura, V.M., Yamaguchi, S., DeRosier, D.J., & Macnab, R.M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6304–6308.
- Oosawa, K., Ueno, T., & Aizawa, S. (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 3683–3691.
- Lloyd, S.A., Tang, H., Wang, X., Billings, S., & Blair, D.F. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 223–231.
- Tang, H., Braun, T.F., & Blair, D.F. (1996) *J. Mol. Biol.*, **261**, 209–221.
- Zhou, J. & Blair, D.F. (1997) *J. Mol. Biol.*, **273**, 428–439.
- Zhou, J., Lloyd, S.A., & Blair, D.F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6436–6441.
- Okunishi, I., Kawagishi, I., & Homma, M. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 2409–2415.
- Okabe, M., Yakushi, T., Asai, Y., & Homma, M. (2001) *J. Biochem.*, **130**, 879–884.
- Terashima, H., Fukuoka, H., Yakushi, T., Kojima, S., & Homma, M. (2006) *Mol. Microbiol.*, **62**, 1170–1180.
- Terashima, H., Koike, M., Kojima, S., & Homma, M. (2010) *J. Bacteriol.*, **192**, 5609–5615.
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., & Aizawa, S. (1992) *J. Mol. Biol.*, **226**, 433–446.
- Kubori, T., Yamaguchi, S., & Aizawa, S. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 813–817.
- Macnab, R.M. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 7149–7153.
- Namba, K., Yamashita, I., & Vonderviszt, F. (1989) *Nature*, **342**, 648–654.
- Minamino, T. & Macnab, R.M. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 1388–1394.
- Jones, C.J., Macnab, R.M., Okino, H., & Aizawa, S. (1990) *J. Mol. Biol.*, **212**, 377–387.
- Sosinsky, G.E., Francis, N.R., DeRosier, D.J., Wall, J.S., Simon, M.N., & Hainfeld, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4801–4805.
- Homma, M., Ohnishi, K., Iino, T., & Macnab, R.M. (1987) *J. Bacteriol.*, **169**, 3617–3624.
- Jones, C.J., Homma, M., & Macnab, R.M. (1987) *J. Bacteriol.*, **169**, 1489–1492.
- Jones, C.J., Homma, M., & Macnab, R.M. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 3890–3900.
- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T., & Macnab, R.M. (1990) *J. Mol. Biol.*, **211**, 465–477.
- Dailey, F.E. & Berg, H.C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1043–1047.
- Hizukuri, Y., Yakushi, T., Kawagishi, I., & Homma, M. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 4190–4197.
- Okabe, M., Yakushi, T., Kojima, M., & Homma, M. (2002) *Mol. Microbiol.*, **46**, 125–134.
- Hosogi, N., Shigematsu, H., Terashima, H., Homma, M., & Nagayama, K. (2010) *J. Struct. Biol.*, **173**, 67–76.
- Kojima, S., Shinohara, A., Terashima, H., Yakushi, T., Sakuma, M., Homma, M., Namba, K., & Imada, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7696–7701.
- Macnab, R.M. (1992) *Annu. Rev. Genet.*, **26**, 131–158.
- Liu, X.Y. & Matsumura, P. (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 7345–7351.
- Hughes, K.T., Gillen, K.L., Semon, M.J., & Karlinsey, J.E. (1993) *Science*, **262**, 1277–1280.
- Kutsukake, K. & Iino, T. (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 3598–3605.
- Chevance, F.F. & Hughes, K.T. (2008) *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 455–465.
- Kojima, M., Nishioka, N., Kusumoto, A., Yagasaki, J., & Homma, M. (2011) *Microbiol. Immunol.*, **55**, 76–83.
- Pandza, S., Baetens, M., Park, C.H., Au, T., Keyhan, M., & Matin, A. (2000) *Mol. Microbiol.*, **36**, 414–423.
- Dasgupta, N., Arora, S.K., & Ramphal, R. (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 357–364.
- Kusumoto, A., Kamisaka, K., Yakushi, T., Terashima, H., Shinohara, A., & Homma, M. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)*, **139**, 113–121.
- Kusumoto, A., Shinohara, A., Terashima, H., Kojima, S., Yakushi, T., & Homma, M. (2008) *Microbiology*, **154**, 1390–1399.
- Kusumoto, A., Nishioka, N., Kojima, S., & Homma, M. (2009) *J. Biochem. (Tokyo)*, **146**, 643–650.
- Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, H., Aizawa, S., & Macnab, R.M. (1986) *J. Bacteriol.*, **166**, 187–193.
- Zhao, R.H., Pathak, N., Jaffe, H., Reese, T.S., & Khan, S. (1996) *J. Mol. Biol.*, **261**, 195–208.
- Thomas, D., Morgan, D.G., & DeRosier, D.J. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 6404–6012.

- 45) Lloyd, S.A., Whitby, F.G., Blair, D.F., & Hill, C.P. (1999) *Nature*, **400**, 472-475.
- 46) Brown, P.N., Hill, C.P., & Blair, D.F. (2002) *EMBO J.*, **21**, 3225-3234.
- 47) Park, S.Y., Lowder, B., Bilwes, A.M., Blair, D.F., & Crane, B.R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11886-11891.
- 48) Brown, P.N., Mathews, M.A., Joss, L.A., Hill, C.P., & Blair, D.F. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 2890-2902.
- 49) Lee, L.K., Ginsburg, M.A., Crovace, C., Donohoe, M., & Stock, D. (2010) *Nature*, **466**, 996-1000.
- 50) Suzuki, H., Yonekura, K., & Namba, K. (2004) *J. Mol. Biol.*, **337**, 105-113.
- 51) Thomas, D.R., Morgan, D.G., & DeRosier, D.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10134-10139.
- 52) Thomas, D.R., Francis, N.R., Xu, C., & DeRosier, D.J. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 7039-7048.
- 53) Koike, M., Terashima, H., Kojima, S., & Homma, M. (2010) *J. Bacteriol.*, **192**, 375-378.
- 54) Dean, G.E., Macnab, R.M., Stader, J., Matsumura, P., & Burks, C. (1984) *J. Bacteriol.*, **159**, 991-999.
- 55) Stader, J., Matsumura, P., Vacante, D., Dean, G.E., & Macnab, R.M. (1986) *J. Bacteriol.*, **166**, 244-252.
- 56) Asai, Y., Kojima, S., Kato, H., Nishioka, N., Kawagishi, I., & Homma, M. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 5104-5110.
- 57) Sato, K. & Homma, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 20223-20228.
- 58) Yorimitsu, T., Kojima, M., Yakushi, T., & Homma, M. (2004) *J. Biochem.*, **135**, 43-51.
- 59) Braun, T.F., Al-Mawsawi, L.Q., Kojima, S., & Blair, D.F. (2004) *Biochemistry*, **43**, 35-45.
- 60) Sato, K. & Homma, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 5718-5722.
- 61) Zhou, J., Fazio, R.T., & Blair, D.F. (1995) *J. Mol. Biol.*, **251**, 237-242.
- 62) Leake, M.C., Chandler, J.H., Wadhams, G.H., Bai, F., Berry, R.M., & Armitage, J.P. (2006) *Nature*, **443**, 355-358.
- 63) Reid, S.W., Leake, M.C., Chandler, J.H., Lo, C.J., Armitage, J.P., & Berry, R.M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8066-8071.
- 64) Hizukuri, Y., Morton, J.F., Yakushi, T., Kojima, S., & Homma, M. (2009) *J. Biochem.*, **146**, 219-229.
- 65) Kojima, S., Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., Homma, M., & Namba, K. (2009) *Mol. Microbiol.*, **73**, 710-718.
- 66) Lloyd, S.A. & Blair, D.F. (1997) *J. Mol. Biol.*, **266**, 733-744.
- 67) Yorimitsu, T., Sowa, Y., Ishijima, A., Yakushi, T., & Homma, M. (2002) *J. Mol. Biol.*, **320**, 403-413.
- 68) Kojima, S. & Blair, D.F. (2001) *Biochemistry*, **40**, 13041-13050.
- 69) Okabe, M., Yakushi, T., & Homma, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 25659-25664.
- 70) Kojima, S. & Blair, D.F. (2004) *Biochemistry*, **43**, 26-34.
- 71) Braun, T.F. & Blair, D.F. (2001) *Biochemistry*, **40**, 13051-13059.
- 72) Atsumi, T., Sugiyama, S., Cragoe, E.J., Jr., & Imae, Y. (1990) *J. Bacteriol.*, **172**, 1634-1639.
- 73) Kojima, S., Atsumi, T., Muramoto, K., Kudo, S., Kawagishi, I., & Homma, M. (1997) *J. Mol. Biol.*, **265**, 310-318.
- 74) Jaques, S., Kim, Y.K., & McCarter, L.L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5740-5745.
- 75) Kojima, S., Asai, Y., Atsumi, T., Kawagishi, I., & Homma, M. (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**, 1537-1547.
- 76) Yakushi, T., Maki, S., & Homma, M. (2004) *J. Bacteriol.*, **186**, 5281-5291.
- 77) Yorimitsu, T., Sato, K., Asai, Y., & Homma, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 31387-31391.
- 78) Zhou, J., Sharp, L.L., Tang, H.L., Lloyd, S.A., Billings, S., Braun, T.F., & Blair, D.F. (1998) *J. Bacteriol.*, **180**, 2729-2735.
- 79) Terashima, H., Kojima, S., & Homma, M. (2010) *J. Mol. Biol.*, **397**, 689-696.
- 80) Sudo, Y., Kitade, Y., Furutani, Y., Kojima, M., Kojima, S., Homma, M., & Kandori, H. (2009) *Biochemistry*, **48**, 11699-11705.
- 81) Kojima, S., Shoji, T., Asai, Y., Kawagishi, I., & Homma, M. (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 3314-3318.
- 82) Sudo, Y., Terashima, H., Abe-Yoshizumi, R., Kojima, S., & Homma, M. (2009) *Biophysics*, **5**, 45-52.
- 83) Berry, R.M. & Armitage, J.P. (1999) *Adv. Microb. Physiol.*, **41**, 291-337.
- 84) Krulwich, T.A., Ito, M., & Guffanti, A.A. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 158-168.
- 85) Yorimitsu, T. & Homma, M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 82-93.
- 86) Asai, Y., Kawagishi, I., Sockett, E., & Homma, M. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 6322-6338.
- 87) Asai, Y., Kawagishi, I., Sockett, R.E., & Homma, M. (2000) *EMBO J.*, **19**, 3639-3648.
- 88) Asai, Y., Yakushi, T., Kawagishi, I., & Homma, M. (2003) *J. Mol. Biol.*, **327**, 453-463.
- 89) Khan, S., Dapice, M., & Reese, T.S. (1988) *J. Mol. Biol.*, **202**, 575-584.
- 90) Murphy, G.E., Leadbetter, J.R., & Jensen, G.J. (2006) *Nature*, **442**, 1062-1064.
- 91) Yonekura, K., Yakushi, T., Atsumi, T., Maki-Yonekura, S., Homma, M., & Namba, K. (2006) *J. Mol. Biol.*, **357**, 73-81.
- 92) Hizukuri, Y., Kojima, S., & Homma, M. (2010) *J. Biochem. (Tokyo)*, **148**, 309-318.
- 93) Fukuoka, H., Yakushi, T., Kusumoto, A., & Homma, M. (2005) *J. Mol. Biol.*, **351**, 707-717.
- 94) Fukuoka, H., Wada, T., Kojima, S., Ishijima, A., & Homma, M. (2009) *Mol. Microbiol.*, **71**, 825-835.
- 95) Kojima, S., Nonoyama, N., Takekawa, N., Fukuoka, H., & Homma, M. (2011) Submitted.
- 96) Yorimitsu, T., Mimaki, A., Yakushi, T., & Homma, M. (2003) *J. Mol. Biol.*, **334**, 567-583.
- 97) Yakushi, T., Yang, J., Fukuoka, H., Homma, M., & Blair, D. F. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 1466-1472.
- 98) Obara, M., Yakushi, T., Kojima, S., & Homma, M. (2008) *J. Bacteriol.*, **190**, 3565-3571.
- 99) Hengge, R. (2009) *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 263-273.
- 100) Jenal, U. & Malone, J. (2006) *Annu. Rev. Genet.*, **40**, 385-407.
- 101) Tamayo, R., Pratt, J.T., & Camilli, A. (2007) *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 131-148.
- 102) Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., & Romling, U. (2004) *Mol. Microbiol.*, **53**, 1123-1134.
- 103) Amikam, D. & Galperin, M.Y. (2006) *Bioinformatics*, **22**, 3-6.
- 104) Wolfe, A.J. & Visick, K.L. (2008) *J. Bacteriol.*, **190**, 463-475.
- 105) Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., & Dow, J.M. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 8327-8334.
- 106) Ryjenkov, D.A., Simm, R., Romling, U., & Gomelsky, M.

- (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 30310–30314.
- 107) Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., & Gomelsky, M. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 4774–4781.
- 108) Ko, M. & Park, C. (2000) *J. Mol. Biol.*, **303**, 371–382.
- 109) Frye, J., Karlinsey, J.E., Felise, H.R., Marzolf, B., Dowidar, N., McClelland, M., & Hughes, K.T. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 2233–2243.
- 110) Wang, Q., Mariconda, S., Suzuki, A., McClelland, M., & Harshey, R.M. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 7981–7984.
- 111) Blair, K.M., Turner, L., Winkelman, J.T., Berg, H.C., & Kearns, D.B. (2008) *Science*, **320**, 1636–1638.
- 112) Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M., Kaever, V., Sourjik, V., Roth, V., & Jenal, U. (2010) *Cell*, **141**, 107–116.
- 113) Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F., & Harshey, R.M. (2010) *Mol. Cell*, **38**, 128–139.
- 114) Fang, X. & Gomelsky, M. (2010) *Mol. Microbiol.*, **76**, 1295–1305.
- 115) Pratt, J.T., Tamayo, R., Tischler, A.D., & Camilli, A. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 12860–12870.
-