1PA045

MAP2クラスターに依存した微小管脱重合の停止

○市原浩司、北沢秀文、井口雄介、宝谷紘一、伊藤知彦
(名古屋大学・院・理・生命理学)

個々の微小管は重合相と脱重合相を自発的に繰り返す動的不安定性を示す。この際、微小管結合タンパク質の一つであるMAP2が、脱重合相から重合相への変換頻度を増加させることがわかっている。このメカニズムとして、我々は「MAP2は微小管上でクラスターを形成して結合し、そこで脱重合を停止させる」という仮説を提唱してきた。今回我々はウシの脳から精製したMAP2を、SH基を特異的に標識するX-ローダミンヨードアセトアミドを用いて、微小管結合能を損なうことなく蛍光標識することに成功した。MAP2の微小管結合領域に存在するCysには色素がとりこまれないように、MAP2を微小管に結合させた状態で標識反応を行った。その結果、突起領域のみに 2 mol/mol MAP2の色素がとりこまれた。この標識MAP2は未標識のものと同程度の微小管結合能を保持していた。そこでこの標識MAP2を用いて、微小管上のMAP2の分布の蛍光顕微鏡による観察と、その動態の暗視野顕微鏡による解析を同時に行うことが可能になった。その結果、MAP2は微小管全体にわたって結合している場合でも分布は均一でなく、ところどころでクラスターを形成していることがわかった。そしてこれらのクラスターのある部位で、微小管の脱重合が一時的に停止するものが観察された。この結果は上述の仮説を強く支持するものである。

K.Ichihara, H.Kitazawa, Y.Iguchi, H.Hotani, T.J.Itoh
MAP2 cluster-dependent cease of microtubule depolymerization.

1PA047

サルモネラ菌はべん毛タンパク質と病原性因子を特異的にかつ選択的に分泌する

○小森谷薫^{*}、相沢慎一^{*}、東徳洋^{*}、**山口滋 (帝京大学理工学部バイオサイエンス学科、*宇都宮大学農学部、**明治大学商学部)

バクテリアは様々な目的で様々な生体分子を菌体外に分泌する。(1) コミュニケーションの手段 (quorum-sensing) として低分子を、(2) ホスト細胞への侵入 (invasion) のために病原性因子 (pathogen) を、(3) べん毛構築における漏れとしてべん毛タンパク質を分泌する。タンパク質の分泌には膜透過のための特殊な輸送系が必要で、すでに3つ以上のタイプの輸送系が知られている。ほとんどの病原性因子とべん毛タンパク質はシグナル配列をもたず、タイプ III と呼ばれる独自の輸送系を通じて分泌される。このタイプ III 型輸送系は病原性に関してはニードル構造体であり、べん毛においてはべん毛基部構造である。ともに内膜と外膜を貫くロッドとリング構造からなっている。それぞれの系における分泌タンパク質の解析はすでに報告があるが、バクテリアが個体としてどのようなタンパク質をどのような割合で分泌しているか、まだわかっていない。

私たちはサルモネラの培地に分泌された主要なタンパク質をすべて調べた。方法は、分泌タンパク質を TCA 沈殿により集め、SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に blotting したあと、アミノ酸シーケンサーにかけて分析した。その結果、それらは分泌性の病原性因子 (SipA, SipB, SipC, InvJ) とべん毛タンパク質に限定されていることが明らかになった。

また、30 以上のべん毛ミュータントの分泌タンパク質も解析した。その結果、これらのミュータントは SDS ゲルのバンドパターンから4つのグループに分けることができ、分泌タンパク質の解析からべん毛タンパク質専用輸送系の2つの輸送モード (rod-hook モードと flagellin-HAP モード) が明らかになった。べん毛構築における輸送系の役割や病原因子分泌系とべん毛系の相互作用の有無などを議論する。

K. Komoriya, S.-I. Aizawa, H. Azuma, S. Yamaguchi: Analysis of secreted proteins from *Salmonella typhimurium*.

1PA046

バクテリアべん毛ロッド形成における FliE の役割

○相沢慎一^{*}、荻野明子^{*}、飯塚久絵^{*}、*小森谷薫^{*}、**山口滋^{*}、***R.M.Macnab (帝京大学理工学部バイオサイエンス学科、*宇都宮大学農学部、**明治大学商学部、***Yale 大学)

べん毛基部構造体の中心軸を形成するロッドは、べん毛モーターのトルクをフィラメントに伝達する回転軸であり、またべん毛構築におけるタンパク質輸送の導管の役目も果たしている。ロッドの構成タンパク質は FlgB, FlgC, FlgF, FlgG の4種類が同定されている。ロッドは構造的に2つに分けることができ、菌体に近い側をロッド1、遠い側をロッド2と呼ぶ。ロッド2は FlgG だけからなり、ロッド1は残りの3種類のタンパク質で作られている。

ロッドの形成にはこれらのタンパク質だけではなく FliE も必要である。FliE は精製したべん毛基部体の中に含まれているが、その局在や他のタンパク質との関係は不明である。

私たちは fliE ミュータントから擬復帰突然変異体をたくさん収集し、同じ遺伝子内の suppressor のうち、特にべん毛の抜け落ちやすいものを選び出した。これらのミュータントから基部体を精製し、SDS-PAGE で調べたところ FliE の分子量が野生株のものとわずかに異なっていた。また電子顕微鏡観察の結果、これらのミュータントのロッドは野生株よりも長く見えた。そこでロッドの長さ分布を調べたところ、野生株の 8.16 +/- 1.02 nm に対して、ミュータントはそれぞれ 9.13 +/- 0.72 nm (#1), 8.58 +/- 1.01 nm (#2), and 9.72 +/- 0.86 nm (#3)であった。

以上の結果から、FliE は直接ロッドの形成に関わっているものと考えられる。FliE の役割について、ロッドのタンパク質輸送チャネルとしての役割を考慮にいれながら議論する。

S.-I. Aizawa, A. Ogino, H. Iizuka, K. Komoriya, S. Yamaguchi, R.M.Macnab: Roles of FliE in the construction of the flagellar rod of *Salmonella typhimurium*.

1PA048

放射光を用いた直線型べん毛フィラメントの回折データ収集と解析

○長谷川和也¹、小田俊郎²、牧野浩司²、難波啓一^{1,3}
(¹ ERATO・難波プロジェクト、² 理研・播磨、³ 松下・国際研)

べん毛フィラメントやアクチンフィラメントのようにタンパク質がらせん状に重合してできた超分子複合体の構造解析を行うには、X 線繊維回折法が非常に有用である。我々は X 線繊維回折法を用いて L 型と R 型の直線型べん毛フィラメントの構造解析を行っているが、いずれも周期長が非常に長く、層間隔が R 型フィラメントの場合 10 Å 分解能で約 1/425(Å⁻¹)、L 型では更にその半分以下である。従って、隣接する層線を分離するためには、軸配向度の高い液晶試料の作成と、高輝度でビームサイズの小さい X 線が必要となる。遠心による濃縮と強磁場による配向により軸配向度 ~0.6° 程度の液晶試料が再現性よく得られるため、この高配向度試料にシンクロトロン放射光を照射し回折強度データの収集を行った。

実験は第3世代放射光施設 SPring8 のビームライン BL41XU で行った。もともとこのビームラインは結晶解析を目的としているため、ビームストップが繊維軸に平行な厚さ 2mm の板状であることや、コリメーターから生じた寄生散乱により、子午線周辺のデータや回折像の中心付近のデータが損なわれた。X 線繊維回折法では、3次元に分布する回折データが繊維軸まわりに回転平均化されたものを1枚のフレームに記録するためデータの測定多重度が低いことと、解析における小角データの重要度が高いことにより、ビームストップの陰や寄生散乱は構造解析にとって痛手となる。そこで、直径 1mm のフライングビームストップを装着した He チャンバーと、寄生散乱を除くための4象限ガードスリットを新たに作成し、データ収集を行った。長時間の露出は液晶試料にダメージを与えるため露出時間は10秒前後としたが、実験室の高輝度線源による約10時間露出の回折像より高い S/N 比を持つ回折像を得る事ができた。また、放射光の持つ高い平行性とビームサイズの小ささのため、実験室系で得られた回折像に比べて、層線の分離が良くなった。

K. Hasegawa, T. Oda, K. Makino, K. Namba : Data collection and analysis of the bacterial flagellar filament using SPring8 beamline BL41XU