1PA049

バクテリアべん毛ロッドタンパク質の精製と性質（その2）
○西條由見子¹、大澤研二¹、Fadel Samatey¹、今田勝巳¹、
難波啓一^{1,2} (ERATO, 難波プロジェクト¹、松下国際研²)

サルモネラ菌べん毛の基部体にあるロッドは、MS リングからのびて P リングと L リングを貫通しフックにつながる棒状の構造体で、モータで発生した回転力をフックへ伝える軸としての機能を持っている。ロッドを構成しているのは FlgB, FlgC, FlgF, FlgG タンパク質で、これらの性質、三次元構造、および相互作用などを明らかにするために、大腸菌を用いた大量発現系からの精製を試みた。今回、FlgF と FlgG の精製法と性質、各ロッドタンパク質間での相互作用などについて報告する。

大腸菌内で発現された FlgF は、菌体を破壊すると、大腸菌由来のプロテアーゼによって著しく分解される。このプロテアーゼを失活させるために尿素溶液中で大腸菌を破壊し、その可溶性画分を SP-Sepharose カラムにかけたところ、FlgF とプロテアーゼとをほぼ完全に分離することができた。得られた FlgF は尿素を取り除いても分解されず、さらに Q-Sepharose カラムとゲルろ過カラムを用いて、純度の高い FlgF を得ることができた。1L の大腸菌培養液からの収量は 20mg であった。一方、大腸菌内で発現された FlgG は inclusion-body に取り込まれる。この inclusion-body を尿素溶液に溶かし、可溶性画分を SP-Sepharose カラムとゲルろ過カラムにかけることで、純度の高い FlgG を得ることができた。1L の大腸菌培養液からの収量は 45mg であった。

FlgF と FlgG の pH と NaCl 濃度に対する沈殿の有無を調べた。FlgG は 1M NaCl 存在下では pH5~10 の広い範囲にわたり無色ゲル状の沈殿を生じた。昨年の本大会で報告した FlgB と FlgC についての結果から、この沈殿も FlgG が自己集合してできたものと予想される。一方、FlgF は解析を行った条件下では沈殿を生じなかった。

精製された FlgB, FlgC, FlgF, FlgG の質量分析を行ったところ、すべて、べん毛から精製されたものと同じであることが確認された。

現在、FlgB, FlgC, FlgF, FlgG の円偏光二色性分光分析による構造解析と、それぞれの間での相互作用についての解析とをすすめており、その結果についても報告したい。

Y.Saijo, K.Oosawa, F.Samatey, K.Imada, K.Namba : Purification and characterization of bacterial flagellar rod proteins II.

1PA051

Crystal structure analysis of the F41 fragment of flagellin:
a progress report
F.A. Samatey¹、今田勝巳¹、長島重広¹、F. Vonderviszt²、
難波啓一^{1,3} (ERATO 難波プロジェクト¹、²Veszprém 大学、
³松下・国際研)

Bacterial move by rotating the flagellar filaments by the rotary motor. The filament is built by helical assembly of a single protein, flagellin, and is supercoiled to act as a helical propeller. The mechanism of the flagellar supercoiling was put forward by Asakura (1970) as that the filament is composed of two distinct types of conformation or packing arranged in a regular manner. There are actually two distinct types of straight filament structures, called the L- and R-type, which are thought to represent the two subunit conformation or packing in the supercoiled filaments. To understand the structural mechanism of the supercoiling, electron cryomicroscopy and X-ray fiber diffraction have been used to study the structures of the two straight filaments, and X-ray crystallography has been used to reveal the subunit structure in detail. Flagellin from *Salmonella typhimurium* is composed of 494 amino acid residues, and it has a strong tendency to aggregate into filament even at low ammonium sulfate or PEG concentration used to crystallize the protein, which makes it impossible to prepare any 3D crystals. We were able to crystallize a proteolytic fragment of flagellin, F41, which spans from 53 to 450 of the flagellin sequence, into a thin plate crystal. The crystals with the thickness of a few microns made diffraction data collection very difficult. However, using the cryo-crystallographic technique and synchrotron radiation at ESRF and Spring-8, we were able to collect diffraction data for the native to 2.4-Å resolution and for two heavy atom derivatives (Pb and Hg) to 2.0-Å resolution. These data enabled us to calculate a density map, which is currently being refined.

F.A. Samatey, K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, K. Namba: Crystal structure analysis of the F41 fragment of flagellin: a progress report.

1PA050

高粘度培地中でべん毛の抜けるサルモネラ菌 *flhF* 変異体 SJW3060 から得られたリパータントの解析
○小松ひとみ¹、大澤研二¹、山口滋²、難波啓一^{1,3} (ERATO・難波プロジェクト、²明治大学・商学部、³松下国際研)

バクテリアのべん毛の基部体は L リング、P リング、MS リング (FlhF)、ロッド (FlgB, C, F, G) から成る構造体で、C リング (FlhG, M, N) と Mot 複合体 (MotA, B) で構成されるトルク発生装置で生じた回転を、細胞外にあるフィラメントに伝達するために働く。MS リングは、べん毛構築の最初に作られ、そこに輸送器官が構築された後、細胞外に向かって構築が進むことから、べん毛構築における中心的役割を果たしていると考えられる。このように MS リングは様々なタンパク質と相互作用していると考えられ、これらの相互作用を研究することはべん毛構築の機構だけでなく、モータの特徴を知る上で重要である。今までに FlhF と FlhG、FlhM との相互作用は明らかにされているが、その他についてはほとんどが解析されていない。

以前、沖野らにより高粘度培地中で泳ぐことのできない変異体 SJW3060 がとられた。この変異体は MS リングの構成タンパク質である FlhF に変異があり、高粘度培地中で抜け落ちたべん毛にフックとロッドタンパク質 FlgG が存在していた (Okino et al. (1989) J. Bacteriol. 171:2075-2082)。この結果は MS リングとロッドが構造上隣り合っているだけではなく、互いの機能を補い合っている可能性を示唆する。

MS リングと周辺タンパク質との相互作用を解明するために、SJW3060 から泳ぎの回復したリパータントが 504 株とられ、変異部位が解析された。その結果、7 株がべん毛遺伝子の Region I に変異を持つことが明らかにされた。Region I にはロッド、フック、LP リングなどをコードする遺伝子が含まれることから、これらのタンパク質と MS リングの間の相互作用によって、MS リング上の変異が抑制されていると推測される。そこでこれらのリパータント 7 株に関して、変異部位を同定するために配列解析を行った所、MS リングとロッドタンパク質が相互作用している可能性が示された。

H. Komatsu, K. Oosawa, S. Yamaguchi, K. Namba : Analysis of revertants obtained from the *Salmonella flhF* mutant SJW3060 which releases flagellar filaments in viscous conditions

1PA052

バクテリアべん毛とキャップ蛋白質 HAP2 の複合体構造

○米倉 功治¹、眞木 さおり¹、D. G. Morgan²、
D. J. DeRosier²、F. Vonderviszt³、今田 勝巳¹、
難波 啓一^{1,4}

(ERATO 難波プロジェクト¹、Brandeis 大学²、
Veszprém 大学³、松下国際研⁴)

バクテリアのべん毛フィラメントの伸長には、フィラメント先端に結合した「キャップ」が必要である。このキャップは HAP2 蛋白質から構成される。1998 年、Maki らは、フィラメントとキャップ蛋白質の構造を電子顕微鏡で観察し、HAP2 の 5 量体がフィラメントの先端に結合するモデルを提出した。我々はこのモデルの検証、及び HAP2 とフィラメントとの相互作用を調べるため、この複合体構造を低温電子顕微鏡法で解析した。

まず、キャップが結合した再構成フィラメントを加速電圧 300kV のフィールドエミッションガンを用いた電子顕微鏡で、試料温度を 4 - 40K に保ち、撮影した。得られた像のコントラストは低く、x, y の並進を相関から同時に合わせるのは困難であった。そのため、二次元面内の傾きを補正後、並進は x, y 軸にそれぞれ投影した像を用いて合わせた。最後にフィラメントのらせん対称性を利用し、電子線に対する投影方向 (方位角) を決め、450 以上の像からバックプロジェクション法により三次元再構成を行なった。その結果、キャップとフィラメントの相互作用様式をより鮮明に解像できた。

The structure of the filament-HAP2 cap complex of the bacterial flagellum :

Koji Yonekura, Saori Maki, David G. Morgan, David J. DeRosier, Ferenc Vonderviszt, Katsumi Imada and Keiichi Namba