1I1700

ハイブリッド F₁-ATPase を用いた回転ステップの 1 分子解析

○有賀 隆行¹、政池 知子¹、野地 博之²、木下 一彦^{2,3}、吉田 賢右¹ (¹東工大・資源研、²CREST Team13、³慶應大・物理)

F₁-ATPase は ATP の加水分解をエネルギー源として回転する分子モーターである。 $\alpha_3\beta_3$ リングを固定子として、中央に存在する γ サブユニットが回転する。リング中の 3 つの β サブユニットは 3 回対称に配置され、そこで次々に ATP が加水分解されて回転トルクが発生している。この 3 つの β サブユニットの協同性がなければ、 γ サブユニットはスムーズに回転することができないと考えられている。では一体、どのような仕組みで 3 つの β サブユニットは協同しているのだろうか？

F₁-ATPase の回転機構の理解の鍵となるこの協同性を調べるには、1 分子中の 1 つ 1 つの β サブユニットを見分けなければならない。これまでの変異体を用いた研究では、3 つの β サブユニット全てに変異が導入されていた。そのため 1 つの β サブユニットの役割を知ることはできなかった。そこで私は本研究において、1 つの β サブユニットだけに変異を導入するハイブリッド F₁-ATPase 作成法を開発した。さらに、1 つの β サブユニットへの ATP の親和性を変化させた場合に回転にどのような影響が現れるかを調べるため、1 つの β サブユニットのみを ATP 低親和性にしたハイブリッド F₁-ATPase を作成した。3 つの β サブユニット全てを ATP 低親和性にした F₁-ATPase の 1 分子回転観察を行ったところ、野生型では ATP 結合のステップが観察できないような高濃度 ATP 存在下において、3 回対称の β サブユニットに対応して 120° のステップ状の回転をすることが観察された。本研究では、ハイブリッド変異体の回転ステップの解析を行い、そこから得られた知見について報告する。

T.Arigo, T.Masaake, H.Noji, K.Kinosita Jr., M.yoshida : Analysis of rotation step using hybrid F₁-ATPase

1I1730

Na⁺駆動型べん毛モータータンパク質 PomA の融合タンデムダイマーにおける架橋形成

○依光 朋宏、薬師 寿治、本間 道夫 (名大院・理)

バクテリアのべん毛モーターでは回転力発生ユニットによりイオン流がモーターの回転力へと変換されている。Na⁺駆動型べん毛モーターでは PomA、PomB、MotX、MotY の 4 種類の膜コンポーネントにより回転力発生ユニットが構成されていると考えられている。最近、プロテオリボソームに再構成された PomA/PomB 複合体が Na⁺輸送活性を持つことが示された。この複合体中の PomA と PomB は 2:1 の構成比であることが示唆された。また、4 回膜貫通型タンパク質 PomA の融合タンデムダイマー (PomA-PomA) は機能的であり、このダイマーの片方に変異を導入するとその機能が失われることが示された。以上のことから、回転力発生ユニット内での PomA の機能単位はダイマー以上ではないかと示唆されている。一方、PomA の C 末側細胞外 loop に Cys 残基を導入すると PomA 同士の S-S 結合によるダイマー形成が起こり、その機能が阻害される。本研究では PomA-PomA に Cys 残基を導入し、回転力発生ユニットの機能解析を行った。

PomA-PomA の N 末側、C 末側またはその両方の PomA に P172C 変異を導入した P172C-PomA、PomA-P172C、P172C-P172C を作成した。PomA-P172C、P172C-P172C を発現している菌体では還元剤依存的に運動能が回復した。一方、P172C-PomA を発現している菌体の運動は還元剤添加により影響しなかった。これらのタンパク質を western blot で検出すると、すべての置換体で、非還元条件では、架橋による高分子量のバンドが検出された。P172C-P172C では分子内架橋と推測される強いバンドが検出された。この分子内架橋形成は酸化剤により著しく促進された。以上の結果より、PomA の C 末側 loop は 1 つの回転力発生ユニット内で近い位置にあり、互いに向き合っているのではないかと考えられた。本研究結果より、回転力発生ユニットのサブユニット構成モデルに関する議論を行いたい。

T.Yorimitsu, T. Yakushi and M.Homma : Cross-linking of tandem fused PomA dimer in the Na⁺-driven flagellar motor

1I1715

大腸菌 H⁺ 駆動型モーター タンパク質 MotA・MotB によるビブリオ菌 Na⁺ 駆動型極毛モーターの機能回復と共役イオン特性

○浅井 友香子、薬師 寿治、本間 道夫 (名古屋大・院理・生命理)

細菌のべん毛モーターは、イオンの流入を回転力に変換する分子機械であり、その共役イオンによって、H⁺ 駆動型と Na⁺ 駆動型に分けられる。H⁺ 駆動型モーターチャネルのコンポーネントとして MotA、MotB の二つが同定されている。当研究室で扱っている海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* の極毛は Na⁺ 駆動型で、PomA、PomB、MotX、MotY の四つのコンポーネントが必要であることが分かっている。我々は、イオン認識部位の同定を目的として、H⁺ 駆動型と Na⁺ 駆動型のモーターコンポーネントの入れ替え実験を行っている。これまでに、H⁺ 駆動型の MotA、MotB として PomA、PomB と最も相同性の高い *Rhodobacter sphaeroides* のものを用い、*Vibrio* 極毛モーターにおいて、A subunit が交換可能なこと、A subunit や B subunit の膜貫通領域には共役イオン認識部位は存在しないこと、B subunit のリンカー領域がイオンの選択性を決定している可能性があることを 97、99 年生物物理年会で報告した (EMBO J impress)。今回我々は、代表的な H⁺ 駆動型モーターを持つ大腸菌のコンポーネントを用いて、同様な入れ替え実験を行った。その結果、*R. sphaeroides* の時とは異なり、A subunit のみ入れ替えても機能しなかった。しかし、A、B 両方の subunit を入れ替えた場合、わずかではあるが運動能を回復した。また、motX 株、motY 株でも運動能の回復が見られた。これらの結果から、大腸菌 MotAB は、極毛モーター中で単独で働いていることが予測される。以上の結果と共に、その共役イオンについての解析結果を報告する。

Y. Asai, T. Yakushi, M. Homma : Coupling ion specificity of the *Vibrio* polar flagellar motor consisting of *E. coli* H⁺-driven MotAB.

1I1745

Na⁺ 駆動型べん毛モータータンパク質 MotX と MotY の相互作用

○岡部 真裕子、薬師 寿治、浅井 友香子、本間 道夫 (名古屋大・院理・生命理学)

細菌のべん毛モーターは、H⁺ 駆動または Na⁺ 駆動力により回転する。Na⁺ 駆動型のモータータンパク質として PomA、PomB が同定されており、H⁺ 駆動型のモータータンパク質 MotA、MotB とそれぞれ相同性を持つ。MotX と MotY は、Na⁺ 駆動型に特異的な因子である。MotX、MotY は共に 1 つの膜貫通領域を持つ膜タンパク質で、MotY はペプチドグリカン結合モチーフを持つ。MotX については Na⁺ チャネルとしての可能性が示唆されているものの、これらの機能は未だ分かっていない。そこで、Na⁺ 駆動型の極毛べん毛を持つ海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* において、MotX と MotY の解析を行った。

MotX と MotY は共に 2 つのシステイン残基を持つ。MotX の 2 つのシステイン残基をセリンに置換した変異体 (C56S、C87S) を作成したところ、C87S は機能したが C56S は機能しなかった。よって、56 番目のシステイン残基が機能的に重要であることがわかった。また MotX は MotY の大量発現により安定となり、MotY は MotX の大量発現により安定化された。このことから、MotX と MotY は相互作用して、互いに安定化しているものと考えられる。我々は MotY の 2 つのシステイン残基がその機能に重要であるという結果も得ており、MotX と MotY との相互作用が S-S 結合によるものであると考えている。motY 変異株において MotX を大量発現させたところ、わずかに運動能を回復した。このことは、正常な MotY がいない条件下でも大量の MotX によって Na⁺ 駆動型べん毛モーターが機能し、運動能を回復することができることを示している。つまり、べん毛モーターの機能に重要なのは MotX で、MotY は MotX を安定化するために必要な因子であると考察できる。

M.Okabe, T.Yakushi, Y.Asai and M.Homma : Functional analysis of MotX and MotY, the specific motor proteins for the sodium-type flagella.