2J1345

細菌べん毛タンパク質 HAP2 と HAP3 の相互作用

○古川 進朗^{1,2}, 今田 勝巳¹, Ferenc Vonderviszt³, 掛 和弘⁴, 佐野 健一⁵, 難波 啓一^{1,6} (¹ERATO 難波プロジェクト, ²名大・生命理学, ³University of Veszprem, ⁴広島大・生物生産, ⁵松下・国際研, ⁶松下・先端技研)

細菌べん毛の細胞外部分はフック (Flie), フック-フィラメント連結部 (HAP1, HAP3), フィラメント (flagellin), キャップ (HAP2) で構成されている。べん毛構築は、フックの先端に HAP1, HAP3, HAP2 が順に結合した後、HAP3 と HAP 2 の間にフラジェリンが挿入し、フィラメントが伸長することによって進む。HAP1 と HAP3 は力学特性の異なるフックとフィラメントを連結する構造体を形成し、HAP2 はべん毛フィラメント伸長時に細胞内からべん毛先端へ輸送されるフラジェリンの漏出を防ぐとともに、重合を補助する。HAP2 は 5 量体としてキャップ構造を形成するが、溶液中では単量体、5 量体、そして 5 量体が 2 つ結合した 10 量体の平衡状態で存在する。これに対し、HAP3 が形成するのは短らせん構造と予測されているものの、溶液中では単量体、あるいは塩存在下で β アミロイド様のフィラメントとなる。我々は HAP2 と HAP3 の溶液中での相互作用を、分析超遠心およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて解析した。HAP2 の大半が 10 量体で存在する条件下で HAP3 を混合すると、モル比 1:1 の混合によっても 10 量体がほぼ完全に消失し、HAP2-HAP3 の 1:1 複合体形成が観測された。HAP3 (317 残基) の C 末端 31 残基を切断したフラグメントでも同様の結果が確認された。しかし N 末端 80 残基、C 末端 31 残基を切断すると、1:1 複合体の形成はあるものの、HAP2 の 10 量体を完全に消失することはなかった。現在 HAP3 とフラジェリンあるいは HAP1 との相互作用についても解析中である。年会ではこれらタンパク質の相互作用が、フィラメント構築においてどのように関与するか考察する予定である。

Y.Furukawa, K.Imada,F.Vonderviszt, K.Kutsukake,K.Sano and K.Namba : Interactions between flagellar of HAP2 and HAP3 from *Salmonella typhimurium*

2J1415

バクテリアべん毛フィラメントの 2 価陽イオンによる安定化機構

○長谷川 和也¹, 山下 一郎², F.A. Samatey¹, 今田 勝巳¹, 眞木 さおり¹, 米倉 功治¹, 難波 啓一² (¹ERATO・難波プロジェクト, ²松下電器・先端技研)

バクテリアべん毛フィラメントは単一タンパク質分子フラジェリンがらせん状に自己集合することにより構築される超分子複合体である。*in vitro* で再構成されたフィラメントは、低イオン強度緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl pH 7.8) 中では急速に脱重合するが、NaCl や MgCl₂ など塩の存在により脱重合は抑えられる。しかし、100 mM NaCl と 1 mM MgCl₂ が同程度の抑制効果を示すことから、フィラメントの安定化にはイオン強度増加による塩析効果以外の効果も寄与しているようである。また、X 線繊維回折像の赤道線データの解析により、酢酸鉛 (II) 存在下でサブユニットあたり 2 個の鉛イオンが結合することがわかっており、2 価陽イオンの特異的結合が構造安定化に寄与している可能性が示唆された。最近、我々のグループで F41 フラグメントの結晶解析が完了し、その構造とフィラメントのらせん対称性をもとに暫定的な R 型の直線型フィラメントのモデルが構築された。そこで、鉛の重原子位置を X 線繊維回折データの解析より得られた差フーリエ電子密度図より決定し、フィラメントモデルと重ね合わせることで、フィラメント安定化の機構について考察した。フラジェリン分子は 4 つのドメイン (D0, D1, D2, D3) から形成されている。2 つの鉛イオンの内 1 つは最外側ドメイン D3 内にあり、隣接するサブユニットとの相互作用には関わっていない。もう一方は隣あう 2 つのフラジェリン分子のドメイン D1 と D2 が近接する領域にあった。その近傍には、D1 側に Asp156, Asp158, D2 側に Glu386 など、鉛イオンに配位する可能性のある残基が存在していた。これらの側鎖のカルボキシル基が鉛イオンに配位結合することにより、間接的にサブユニット間結合を形成し、フィラメントの安定性を高めていると思われる。

K. Hasegawa, I. Yamashita, F.A. Samatey, K. Imada, S. Maki, K. Yonekura, K. Namba : Stabilization of the bacterial flagellar filament by the binding of divalent cations

2J1400

バクテリアべん毛キャップの回転によるフィラメントの伸長機構

○米倉 功治¹, 眞木 さおり¹, Morgan David², DeRosier David², Vonderviszt Ferenc³, 今田 勝巳¹, 難波 啓一^{1,4} (¹ERATO 難波プロジェクト, ²Brandeis 大学, ³Veszprem 大学, ⁴松下先端技研)

べん毛フィラメントの伸長は、セントラルチャネルを通して運ばれた構成分子フラジェリンが、その先端に組み込まれていくことで起こる。べん毛先端には 5 量体の HAP2 蛋白質からなる「キャップ」が存在し、フラジェリンが溶媒中にリークするのを防ぎ、効率よく結合するのを助けている。我々は、べん毛フィラメントと HAP2 キャップの複合体を低温電子顕微鏡で撮影、バックプロジェクション法により三次元再構成を行った。その結果、フィラメント先端に直径 12 nm、厚さ 2.5 nm の五角形のキャップ様構造、その直下に、セントラルチャネルに繋がる直径 5 nm、高さ 7 nm の空洞を解像することができた。セントラルチャネルは直径 3 nm と細いため、フラジェリンは少なくとも部分的にフォールディングを崩し先端まで運ばれていく。そして、キャップ直下の空洞で正しく巻き戻りフィラメントに組み込まれていくと考えられる。また、フィラメントとキャップの対称性が異なるため、HAP2 の各サブユニットはそれぞれわずかに異なるコンフォメーションをとると考えられる。実際、得られた構造には、ほぼフラジェリン一分子大のキャップが一方に存在し、そこが次のフラジェリン結合部位であると同定された。一方、溶液中で形成する HAP2、10 量体の負染色像を集め三次元再構成したところ (眞木ら、未発表)、キャップ直下に長さ 9 nm の細い「足」の存在が確認された。これがフィラメントとの結合ドメインで、フィラメントの対称性に合わせてコンフォメーションを変えうる高い自由度を持つ。以上のことから、フラジェリンの結合の度に、キャップは 6.5 度 (= 360 度 / 5 / 11) 回転、フィラメントは 0.47 nm 伸び、それに伴い HAP2 の足の配置が変わり次の場所に新たな結合部位を形成するというモデルを提案する。

Koji Yonekura, Saori Maki, David G. Morgan, David J. DeRosier, Ferenc Vonderviszt, Katsumi Imada and Keiichi Namba : Rotational assembly-promotion mechanism at the site of flagellin assembly revealed in the flagellar cap structure

2J1430

フラジェリン F41 フラグメントの原子モデルから明かとなったサブナノメータの機械的スイッチ

○Samatey Fadel¹, 今田 勝巳¹, 長島 重広¹, Vonderviszt Ferenc², 熊坂 崇³, 山本 雅貴³, 難波 啓一^{1,4} (¹ERATO 難波プロジェクト, ²ヴェスプレム大学, ³理研 播磨研究所, ⁴松下電器産業 (株))

In order to understand the mechanism of supercoiling and switching of the bacterial flagellar filament, X-ray crystallographic analysis has been carried out on a 41 kDa fragment of flagellin, F41. F41 crystals were all very thin, less than 10 μ , but diffracted to 1.9 Å resolution at -170 °C. A MAD data set collected at beam line BL45XU at SPring-8 produced a 3D map of high quality, on which the atomic model has been built and refined. The structure showed three domains, D1, D2 and D3, just as shown previously by electron cryomicroscopy and X-ray fiber diffraction. While D1 domain is composed of α -helices and a β -hairpin, D2 and D3 domains are mostly made out of β -strands. The packing of the F41 molecules in the crystal is similar to the packing in the protofilament. The repeat distance along the protofilament in the crystal is identical to that of the R-type straight filament. This result indicates that the switching mechanism for the two distinct states of the protofilament, which have slightly different repeat distances presumably responsible for the curvatures of the supercoiled filaments, must be found in the protofilament structure. A structural motif connected to the β -hairpin in domain D1 appeared to be implicated in this mechanism. A simulation of stretching a protofilament showed a conformational transition in this motif, suggesting the direct involvement in the switching mechanism.

F. A. Samatey, K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, K. Namba : Subnanometer mechanical switch revealed in the atomic model of F41 fragment of flagellin