2J1445

バクテリアべん毛基部位 FliF リング及び FliF-FliG リングの円筒平均構造

○鈴木 博文¹、米倉 功治¹、難波 啓一^{1,2} (¹ERATO 難波プロジェクト、²松下・先端技研)

サルモネラ菌などのべん毛では、回転力発生、回転方向変換、蛋白輸送等の機構は内膜付近に集中している。その核ともいえる MS リング部は、べん毛全体の基盤をなす FliF と回転力発生に直接関わる FliG、それぞれ 25 個前後がリング状に集まることによって構成される。我々は大腸菌大量発現系からの FliF リングと FliF-FliG リングの可溶化法、精製法を確立し、負染色電子顕微鏡像の単粒子解析から円筒平均構造を得た。また、既知のべん毛基部位全体像と比較し、そのドメイン構造についてのいくつかの新しい知見を得た。(1)FliF はリング内部にもドメインを形成する。アミノ酸配列等の情報からこのドメインは蛋白輸送に関わると示唆される。(2)ロッドは FliF リングの上部に差し込まれるように構築される。これは対称性の異なる構造どうしを強固に結合するのに適した様式といえる。(3)FliG は M リング外周の膜接触部から細胞質側までを占める。

図.FliF リング (左) と FliF-FliG リング (右) の円筒平均構造の断面

H.Suzuki, K.Yonekura and K.Namba : Cylindrically averaged structures of the bacterial flagellar FliF ring and FliF-FliG ring

2J1530

高粘度培地中でべん毛の抜けるサルモネラ菌 *fliF* 変異体 SJW3060 から得られたリバータントの解析 -Region II、Region III について-

○小松 ひとみ¹、山口 滋²、難波 啓一^{1,3}、大澤 研二^{1,4} (¹ERATO・難波プロジェクト、²明治大・商学部、³松下・先端技研、⁴名古屋大・多元数理)

バクテリアのべん毛構築において、MS リングは中心的役割を果たしており、近傍の様々なタンパク質と相互作用していると考えられている。既にスイッチタンパク質との相互作用が報告されているが、さらに他の相互作用を研究することは、べん毛構築機構の解明だけでなく、モーターの性質を知る上でも重要であると考えられる。

昨年我々は *fliF* 変異体 SJW3060 のリバータントのうち、べん毛の遺伝子 Region I に変異部位を持つ 4 株が、ロッド構成タンパク質をコードする遺伝子に変異が存在することを報告し、MS リングとロッドの間の相互作用の可能性を示唆した。今回は Region I 以外に復帰突然変異が存在すると考えられる 463 株の配列解析を行った。その結果 Region II に変異部位を持つ 164 株が Mot 複合体をコードする *mot* 遺伝子に変異を持っていた。また Region III に関しては 135 株が C リングをコードする *fliG*、*fliM* に変異部位が存在していた。

抑制変異が多く生じた遺伝子は、トルク発生に深く関与すると既に報告されている *motA*、*motB*、*fliG*、*fliM* であった。この結果から、これら 4 つの遺伝子に生じた変異の結果、トルクが弱まり、*fliF* の変異にもかかわらず、べん毛は抜けにくくなり、泳ぎが回復した可能性が考えられる。一方 Region II に生じた抑制変異が *motA*、*B* に存在していたことから、MS リングと Mot 複合体の間の直接的な相互作用の可能性も示唆される。さらに変異頻度の高い部位がそれぞれの遺伝子につき数カ所存在することから、これらの変異を単離し、改めて解析することは、モーターのトルク発生メカニズムを解明する上で極めて重要であると示唆される。

H.Komatsu, S.Yamaguchi, K.Namba, K.Oosawa : Analysis of revertants from a *Salmonella fliF* mutant, SJW3060, which releases the flagella in viscous conditions - in Region II and III-

2J1500

サルモネラのべん毛特異的蛋白質輸送過程における FliH と FliI の相互作用の解析

○南野 徹^{1,2}、Macnab Robert¹ (¹ Yale Univ. Dept of MB&B、²ERATO 難波プロジェクト)

サルモネラの運動器官であるべん毛は基部位、フック並びに繊維の少なくとも 3 つの部分構造からなる高次構造体である。基部位は、細胞表層膜系内にあり、フックと繊維は細胞外に存在する。細胞質内で合成された大部分のべん毛構成蛋白質は輸送に際してプロセッシングを受けず、べん毛特異的輸送装置と呼ばれる特異的な輸送系により、それらがアセンブリーする場まで運ばれる。我々はべん毛構成蛋白質の輸送を直接モニターする系を構築し、べん毛特異的輸送装置が 6 つの細胞膜内在性蛋白質 FliA、FliB、FliO、FliP、FliQ、FliR および 3 つの細胞質性蛋白質 FliH、FliI、FliJ からなることを明らかにした。

ATPase である FliI は、その C 末領域に FoF1 ATPase の β サブユニットと高い相同性を示す ATPase ドメインを持つ。ATPase の活性中心に突然変異を持つ FliI は野生株の運動性を阻害するが、N 末領域に突然変異を持つものは阻害しないことから、FliI の N 末領域は他の輸送装置の構成因子との相互作用に重要であると提案されている。一方、FliH の作用機構については明らかにされていないが、最近の我々の研究から、FliH は細胞質内で FliI と複合体を形成しているものと推定されている。

今回、さまざまな mutant FliI を作製し、FliH-FliI 蛋白質間相互作用について詳細に解析した結果、FliH 2 量体が FliI の N 末領域に結合し、その ATPase 活性を著しく低下させることが判明した。

T.Minamino and R.M.Macnab : FliH, a component of the flagellar export apparatus of Salmonella, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity

2J1545

細菌べん毛基部位タンパク質 FliE の精製と性質

○西條 由見子¹、大澤 研二^{1,2}、南野 徹¹、Macnab R. M.³、難波 啓一^{1,4} (¹ERATO・難波プロジェクト、²名大・多元数理、³Yale 大学、⁴松下・先端技研)

サルモネラ菌べん毛基部位にあるロッドは、MS リングから伸びて L リングと P リングを貫通しフックにつながる構造体で、モーターで発生した回転力をフックへ伝える軸として機能する。私たちはロッドの構造を明らかにする目的で、大腸菌大量発現系から精製したロッドタンパク質 (FliB、FliC、FliF、FliG) の結晶化とロッドの再構成を試みている。

以前より、FliE タンパク質が MS リングとロッドの近辺に局在し、ロッドの形成に関わっていることが示唆されていたが、最近、南野らによって、FliB と FliE の相互作用が示された (J. Bacteriol. (2000) 182, 3029-3026)。私たちは FliE がロッド再構成へのカギになるのではないかと考え、大腸菌大量発現系からの精製を試みたので、その精製法と性質について報告する。

大腸菌内で発現された FliE は inclusion-body を形成する。これを尿素溶液に溶かして得られた上清から、陽イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いて純度の高い FliE を得ることができた。500ml の大腸菌培養液からの収量は 40mg であった。精製された FliE の質量分析の結果から、大腸菌内で発現された FliE は、サルモネラ菌べん毛から直接精製された FliE と同様、N 末端の Met が切除されていることが確認された。単量体として得られた FliE を 4℃ で保存しておくとし沈殿を生じ、電子顕微鏡で観察したところ、繊維状の構造体が見られた。これは、FliB、FliC、FliG で見られた構造体と非常によく似ていることから、FliE が β -アミロイド構造体を形成したと考えられ、ロッドタンパク質と共通の性質を持っていることが示唆される。

Y. Saijo, K. Oosawa, T. Minamino, R. M. Macnab and K. Namba : Purification and characterization of FliE, a bacterial flagellar basal-body protein.