2J1600

サルモネラ菌べん毛モーターH⁺チャネル構成蛋白質 MotA、MotBの大量発現系の構築

○杉山 滋¹、大澤 研^{1,2}、難波 啓一^{1,3} (¹ERATO・難波プロジェクト、²名大多元数理、³松下先端技研)

細菌べん毛モーターのコンポーネントの1つである Mot 複合体は、MotA と MotB の2種の膜貫通蛋白質から構成されており、モーターの固定子としてイオン透過やトルク生成に重要な役割を果たすと考えられている。Mot 蛋白質の構造や機能を解析することは、モーターの回転機構を解明していく上で大変重要であるが、そのような解析を進めるには、大量の精製蛋白質が必要となる。

大腸菌の MotA、MotB については、既に大量発現系が構築されていたが¹、発現量はそれほど多くなかった。一方、サルモネラ菌の MotA 及び MotB については、大量発現系構築の報告はない。今回、我々は、サルモネラ菌 MotA、MotB の大量発現系を構築し、蛋白質の精製を試みたので、その結果を報告する。

当初、プロモーターの種類や培養条件によっては、発現誘導直後から菌の著しい生育阻害が観察され、Mot 蛋白質を大量かつ急激に発現させることは、菌にとって有害であることがわかった。そのため、Mot 蛋白質の大量発現が困難であったが、様々な条件探索の結果、tac プロモーターを有するベクターを用いて *motA* 及び *motB* を共発現するプラスミドを構築し、これを大腸菌に導入して 25~30℃で培養を行うことによって、大量発現に成功した。蛋白質の発現は、MotA 及び MotB の部分アミノ酸配列を抗原とするペプチド抗体を用いた Western blotting により確認した。MotA、MotB の発現量は、SDSPAGE のクマシー染色のバンド濃度からの推測では、ともに、大腸菌培養液 1 リットル当たり 3~4 mg 程度である。発現された蛋白質は膜分画にあり、界面活性剤の検討を行った結果、sucrose monolaurate による可溶化が有効であることがわかった。現在、イオン交換カラム、ゲル濾過カラム、硫酸沈殿等を用いた精製法の検討を進めている。

1) Wilson, M. L. et al. (1990) J. Bacteriol. 172, 3932-3939.

S. Sugiyama, K. Oosawa and K. Namba : Co-overexpression of *Salmonella* MotA and MotB proteins: putative proton channel components of the flagellar motor

2J1630

バクテリアべん毛フックの長さ制御機構

○相沢 慎一¹、牧島 繁¹、小森谷 薫²、山口 滋³ (¹帝京大・理工、²宇大・農、³明大・商)

バクテリアのべん毛フックは、べん毛モーターで発生したトルクをべん毛繊維に伝えるジョイントの役割を果たす短い管状繊維である。フックはべん毛繊維に比べてよく長さがそろってはいるが厳密に一定というわけではない。長さの分布をとると、平均値 55nm (標準偏差 6nm) で、もしモノサシ分子によって制御されているとすると誤差が大きすぎる。従来から、fliK 遺伝子が欠損すると、ポリフックとよばれる異常な長さのフックを産生することから、FliK 分子がフックの長さ制御に直接関わる因子であると考えられてきた。しかし、欠損の大きさが様々であるにも関わらず、fliK ミュータントはすべてポリフックを産生することから、FliK 自身がモノサシ分子ではないことが明らかである。私たちは野生株よりも短いフックを産生するミュータントを遺伝子 fliG、fliM、fliN の中に見出し、その解析を行ったので報告する。現在、遺伝子 fliG、fliM、fliN はべん毛モーターの回転切り替えに必要な因子 (Che-) なので、スイッチ遺伝子として知られている。さらにまた、トルク発生にも関わる (Mot-) のでべん毛モーターの部品の一部 (C リング) であることがわかっている。私たちはこれまで解析されたこれらのミュータントがすべて短いフックをもっていることを発見した。また、それらの長さ分布をとったところ、45nm と 25nm の不連続な 2 種類の群に分類された。これらの現象は、C リングがフックタンパク質の量を測る計量カップの役割をしていると考えたと説明がつく。また、なぜフックの長さが不連続に現れるのか、すなわち量子化が起こるのかについても説明できるモデルを提案する。

S.-I.Aizawa, S. Makishima, K. Komoriya, S. Yamaguchi : The mechanism of length control of the flagellar hook

2J1615

バクテリアべん毛フックタンパク質 H32 フラグメントの大量発現、精製、結晶化

○松波 秀行¹、Samatey Fadel¹、今田 勝巳¹、難波 啓一^{1,2} (¹ERATO・難波プロジェクト、²松下・先端技研)

バクテリアのべん毛フックはフックタンパク質 FlgE が構成する 55 nm ほどの短い繊維で、べん毛モーターの回転トルクをフィラメントに伝達するユニバーサルジョイントとしての役割を担う。サルモネラ菌の FlgE は 403 アミノ酸残基からなる。モノマーでは N 末端 約 70 残基と C 末端 約 30 残基がしっかり折れたたまっておらず、タンパク質分解酵素により容易に切断を受ける。限定分解によりこれらの領域を欠失した分子量 32 kDa のドメイン (H32) は完全に重合能を失い、モノマーとして安定に存在する。そこで、X 線結晶線構造解析によるフックの高次構造解明を目指して、大腸菌による H32 の大量発現系を構築し、結晶化を試みた。

まず、H32 (Gly72 - Lys370) の塩基配列をもとに、開始コドン Met を付加するプライマーおよび終止コドンを導入するプライマーを作成し、PCR 法を用いて *Salmonella typhimurium* SJW1103 のゲノム DNA から目的のフラグメントを増幅した。得られたフラグメントを発現ベクターにクローニングし、大腸菌 BL21(DE3) を用いて目的蛋白質の大量発現を行った。細胞破碎後、可溶性画分から各種クロマトグラフィーにより H32 を精製し、電気泳動的に単一バンドであることを確認した。また、質量分析により、目的のアミノ酸配列をもったフラグメントを単一ピークとして確認した。結晶化条件の探索は蒸気拡散平衡法で行い、PEG を沈殿剤として薄層平板状の小さな結晶を得た。平板の大きさは 0.1 mm 程度、厚さは数ミクロンであったが、クライオ用ループで取り上げ凍結し、SPRING-8 ビームライン BL40B2 にて回折像を記録したところ、3 Å 分解能の反射を確認した。現在、結晶化条件の最適化を行っている。

H.Matsunami, F.A.Samatey, K.Imada and K.Namba : Overexpression, purification and crystallization of the H32 fragment of bacterial flagellar hook protein

2J1645

海洋性滑走細菌 *Saprospira grandis* の ixotrophy とべん毛

○小森谷 薫¹、相沢 慎一²、Lewin R.A.³ (¹宇大・農、²帝京大・理工、³スクリプス海洋研)

海洋性バクテリア *Saprospira grandis* はグラム陰性のらせん細菌で、多くの細胞が未分離のまま数珠状につながっており長いものでは全長が 0.5mm にも達する。溶液に浮遊しているときは泳ぐことはできないが、個体同士が絡まったり、スライドガラスなどの固体表面に接触したりすると滑走運動を示す。また、*S.grandis* はべん毛運動で泳いできた他のバクテリアが接触すると、それをそのまま菌体表面に捕捉する ixotrophy というおもしろい現象を示す。我々は *S.grandis* が短いべん毛を持っていることを発見した。このべん毛は菌体表面からたくさん生えているが、せいぜい 1 波長の長さしかない。波長が約 1.5 ミクロンであることから右巻きのカリー型と思われる。また、構造的に不安定で、溶液から塩を除くと脱重合して溶けてしまう。*S.grandis* の培養液に *Vibrio* などのべん毛で遊泳するバクテリアを混ぜると、*Vibrio* の菌体が *S.grandis* の菌体表面に吸い込まれるように捕捉される様子が観察される。それはちょうどハエがハエ取り紙に捕まる時の様子に似ていることから fly-paper-trapment と呼ばれる。餌食がたくさんつかまると *S.grandis* の菌体同士が凝集を始め、約 30 分後には直径が数 mm の大きな球状の塊になる。これらの観察から、べん毛をもつ *S.grandis* がなぜ滑走運動を示すのか、どのようにして fly-paper-trapment を行うのかを議論する。

K.Komoriya, S.-I.Aizawa, R.A.Lewin : Roles of flagella in ixotrophy of a marine gliding bacteria, *Saprospira grandis*.