2P121

バクテリアべん毛基部体 LP リングの大量発現系の構築

○松波 秀行¹、難波 啓一^{1,2} (¹ERATO 難波プロジェクト、²松下電器 先端技研)

べん毛基部体の一部である LP リングはそれぞれ L および P リングの二種のタンパク質で構成されており、べん毛モータを細胞外膜に固定する軸受けであると考えられている。べん毛モータが滑らかに回転し発生したトルクがフィラメントに伝達する過程では LP リングとそれを貫くロッドとの相互作用が重要な役割を担っており、摩擦せず摩擦もほとんどない、エネルギー変換効率に優れたタンパク質ナノマシンである。このように特異な物理的機構を理解するためには原子レベルの構造情報が必要である。

LP リングのような超分子複合体の構造解析法として電子顕微鏡像の解析や X 線結晶構造解析が挙げられるが、いずれにしても高分解能の解析に必要な二次元結晶や単結晶を作成するには大量に試料を調製することが不可欠である。ただ、サルモネラ菌野生株の場合、LP リングは菌体当たり数個程度しか存在しないため収量が極めて少なく、十分な試料を調製するのが困難であった。そこで遺伝子工学的に LP リングの大量生産を試みた。まず LP リングをコードする *flgH* および *flgI* 遺伝子をサルモネラ菌のゲノム DNA から増幅し、タンパク質発現用プラスミドを構築した。

LP リング複合体形成には、細胞質内で共発現した L および P リング構成蛋白質 (FlgH および FlgI) がタンパク質輸送機構によってそれぞれ外膜とペプチドグリカン層に運ばれる必要がある。その際、タンパク質輸送のシグナル配列を持った前駆体型タンパク質として発現し、輸送後のプロセッシングによって成熟型となり、外膜内に LP リングが大量形成することを期待する。一方、輸送シグナルを削除した成熟型タンパク質としての FlgH と FlgI をそれぞれ単独で大量発現を行う場合は、細胞質内に蓄積したものを精製した後に複合体の再構成が必要となる。これら二通りの戦略を並行して進め、現在電子顕微鏡による観察に向けて最適な方法を模索中である。

K. Matsunami and K. Namba : Construction of Expression Systems for the Bacterial Flagellar LP-Ring Proteins

2P123

バクテリアべん毛蛋白質 HAP2 が構成するキャップ複合体の X 線結晶構造解析

○今田 勝巳¹、真木 さおり¹、米倉 功治¹、Samatey Fadel¹、長島 重広¹、古川 進朗¹、難波 啓一^{1,2} (¹ERATO・難波プロジェクト、²松下電器・先端技研)

細菌べん毛フィラメントは、べん毛中央部のチャンネルを通して菌体内から輸送されたフラジェリンがべん毛先端のキャップの直下に組み込まれることにより伸長する。キャップは 5 個の HAP2 蛋白質から成り、溶液中ではこの 5 量体が向かい合わせになり 10 量体を形成することが知られている。最近、フィラメント・キャップ複合体および 10 量体 HAP2 の低温電子顕微鏡法による構造解析が行われ、輸送されてきたフラジェリンのフォールディングが起こると考えられる大きな空洞がキャップ直下に存在すること、フィラメントの対称性に合わせてコンフォーメーションを変える足が HAP2 に存在すること、五角形の HAP2 キャップが回転しながらべん毛成長が起こることが明らかになった。我々は、さらに詳細なべん毛成長機構を明らかにするため、10 量体 HAP2 の X 線結晶構造解析を行っている。PEG4K と DMSO の存在下で得られた結晶 (空間群 C2、a=225 Å、b=156 Å、c=211 Å、beta=101°) を用い、SPRING8 BL41XU にて回折強度データを収集した。3.5 Å までの回折データを収集したが、回折強度の異方性のため、4 Å 分解能で処理を行い、R_{int}=8.9、completeness=99% のデータを得た。このデータを用いた自己回転関数の計算結果から、5 回回転軸の方向 (b 軸に垂直かつ c 軸と約 70 度) と、5 回回転軸に垂直な 2 回回転軸の方向が判明し、結晶中での分子の配向が明らかになった。また、電子顕微鏡法より明らかになった 10 量体 HAP2 の大きさから、結晶の非対称単位中に HAP2 は 5 分子含まれることがわかった。現在、電子顕微鏡法で得られた 5 量体 HAP2 の低分解能構造を初期モデルとし、solvent flattening と非結晶学対称性を用いた位相拡張により 4 Å での構造解析を進めている。

K. Imada, S. Maki-Yonekura, K. Yonekura, F. Samatey, S. Nagashima, A. Furukawa and K. Namba : X-ray crystallographic study of the bacterial flagellar HAP2 cap complex

2P122

X 線小角散乱によるべん毛タンパク質輸送装置を構成するタンパク質複合体の化学量論的組成の決定

○長谷川 和也¹、南野 徹¹、Tame Jeremy²、難波 啓一^{1,3} (¹ERATO・難波プロジェクト、²横浜市大院・総合理学、³松下電器・先端技研)

FliH と FliH はべん毛タンパク質を輸送するタイプ III の輸送装置の一部を構成し、それぞれ 50kDa と 25 k Da の分子量をもつ。FliH は ATPase 活性をもち、ATP の加水分解で得られるエネルギーが輸送に使用されると考えられている。FliH は FliI に結合し、その ATPase 活性を制御することにより、べん毛タンパク質の輸送制御に関わっていると考えられている。これまでの研究では、生化学の実験では FliI と FliH は 1:2 の複合体を形成しているという結果が得られているのに対し、分析型超遠心による実験結果は 1:1 複合体を形成していることを示唆した。そこで、X 線小角散乱の散乱角度 0 度の強度 (I(0)) が溶質の分子量に比例することを利用し、分子量が既知のタンパク質を標準試料として用いて FliI-FliH 複合体の分子量を求めることを試みた。実験は第 3 世代放射光施設 SPring-8 のビームライン BL40B2 において波長 1.5 Å の X 線を用いて行った。標準試料として卵白リゾチーム、ウシ血清アルブミン、ウシ肝臓カタラーゼを用いた。各試料 5 つの濃度で測定を行い、外挿により無限希釈状態での散乱曲線を得た後、ギニエプロットにより I(0) を求めた。標準試料のギニエプロットには十分な直線領域が存在し精度良く I(0) を求める事ができたが、FliI-FliH 複合体は照射によるダメージがみられ I(0) を求めるには至らなかった。しかし、標準試料の I(0) に対し分子量をプロットした後、最小二乗法により原点を通る直線をフィッティングすると直線からの根二乗平均変位が約 3000 であり、FliI-FliH 複合体の I(0) さえ測定できればその組成を決定できる事がわかった。また、この結果は、我々の用いた方法が超分子複合体の分子量測定に有効であることを示している。

K. Hasegawa, T. Minamino, J. Tame, K. Namba : Stoichiometry determination of the component of the flagellar typeIII transport apparatus by small angle X-ray scattering

2P124

病原性大腸菌 EPEC の表面超分子構造体の構造解析

○相沢 慎一¹、高橋 則子¹、ダニエル セイラ² (¹帝京大学理工学部、²ロンドン王立大学)

腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic E.coli ; EPEC) は乳幼児や老人に急性胃腸炎を引き起こす日和見感染菌である。その感染初期のメカニズムはまだ不明な点が多いが、細菌表面の超分子構造が大きく関わっていることが示唆されている。すなわち、べん毛は運動性を通して細菌の拡散を促し、線毛 (pili ビリ) はホストの腸管に付着してコロニー形成を助ける。また、タンパク質分泌装置であるニードル構造体およびホストの腸管に直接吸着する EspA フィラメントは、ともにホストに直接病原性因子を送りこむのに不可欠である。我々はこれら表面超分子構造体の相関を明らかにするとともに、電子顕微鏡によりその構造解析を行なった。これらはすべて一見すると同じように見える繊維であるが、直径と長さが異なるのでお互いに区別できることがわかった。べん毛がらせん形で直径 15-18nm、長さまちまちであるが超分子構造体中でもっとも長く数 μ m である。EspA フィラメントは柔らかい直線状 (染色条件で形態が変化する) で直径 10-12nm、長さは 0.5-1 μ m であった。線毛は固い直線状 (どんな条件下でも直線) で直径 7nm、長さはまちまちで数 100nm から数 μ m までである。ニードルは直線状で直径は線毛と同様に 7nm くらいであるが、長さは短く 200nm くらいで一定である。これらの繊維状構造体のうち、EspA フィラメントとニードルの関係が不明であった。我々はこれらが同じタイプ III 型輸送系に属し、タンパク質発現の順序に関係して合前後して現れることから、これら 2 つの構造体が直接結合している可能性が高いと判断し、さらに詳しい構造解析を進めている。

S.-I.Aizawa, N.Takashima, and S.Daniel : Structural analysis of supramolecular structures on the surface of Enteropathogenic E.coli (EPEC)