3P169

Na⁺ 駆動型べん毛モーター構成因子 PomA の推定トルク発生領域の解析

○依光 朋宏、薬師 寿治、本間 道夫（名大院・理学・生命）

V. alginolyticus の Na⁺ 駆動型べん毛モーターでは 4 つのトルク発生必須遺伝子 (*pomA*, *pomB*, *motX*, *motY*) が同定されている。大腸菌の H⁺ 駆動型モーターでは PomA の相同因子 MotA の荷電アミノ酸残基 R90/E98 と回転子構成因子 FliG の荷電残基間での静電的相互作用によりトルクが生じるというモデルが提唱されている。この推定静電的相互作用に関与する残基は PomA にも保存されている (R88/E96)。本研究では PomA の荷電残基への変異導入を行い、トルク発生モデルの検証を試みた。

PomA の R88, E96 をそれぞれ Ala, Gln に置換し電荷を中性化した。またこれらの近傍の K89, E97, E99 も同様に置換した。大腸菌 MotA の場合と同様に、R88A, E96Q 変異をそれぞれ単独で持つ PomA を発現している菌体は運動能を保持していた。また K89A, E97Q, E99Q 変異をそれぞれ導入した PomA も機能的であった。次にこれらの変異を組み合わせ二重変異を PomA に導入したが MotA で完全に機能を失うはずの R88A/E96Q だけでなくすべての二重変異でも wt のものと同レベルで機能的であった。しかし、これらすべての残基を中性化 (R88A/K89A/E96Q/E97Q/E99Q) した PomA を発現する菌体は通常の軟寒天培地 (513 mM Na⁺) 上では正常の運動能を示すが、Na⁺ 濃度を 50 mM にした培地上では wt の PomA を発現している菌体に比べて約半分に運動能が低下した。この結果より H⁺ 駆動型モーターの MotA (固定子) の推定トルク発生領域中の荷電残基は *V. alginolyticus* の Na⁺ 駆動型モーターの回転に必須ではないと考えられる。現在電荷を逆転させる変異を導入するなどして解析を進めている。

T. Yorimitsu, T. Yakushi and M. Homma : Putative torque-generating region of PomA, a component of the Na⁺-driven flagellar motor

3P171

Na⁺ 駆動型べん毛モータータンパク質 PomA と PomB の膜貫通領域間相互作用

○薬師 寿治、牧 慎吾、吉村 大輔、浅井 友香子、本間 道夫（名大院・理・生命理学）

【はじめに】海洋性ビブリオ菌の極べん毛は Na⁺ の流入によって回転する分子機械である。その回転力発生には、モータータンパク質 PomA、PomB、MotX、MotY の 4 つの膜タンパク質が必須である。PomA は約 23 kDa で、4 つの膜貫通領域 (TM I-IV) をもっており、PomB と複合体となって Na⁺ チャネルを形成するエネルギー発生装置であると考えられている。また、約 37 kDa の PomB は、N 末端を細胞質に C 末端をペリプラズム側にもつ II 型の内在性膜タンパク質である。本研究では、Cys 残基を導入した PomA と PomB との間でジスルフィド結合を形成させ、膜貫通領域間相互作用の解析を行った。【方法】PomA は、TM I (G23C)、TM II (S34C)、TM III (D170C)、TM IV (A178C) のペリプラズム側に Cys を導入した。PomB はもともと細胞質側に 2 つ (C8, C10)、膜貫通領域に 1 つ (C31) Cys をもつため、4 つ目として膜貫通領域のペリプラズム側に Cys を導入した (S38C)。また、全ての Cys を Ala 置換した Cys-less PomB に変異導入した (CLS38C)。【結果と考察】PomA-D170C (TM III) と PomB-S38C は、それぞれ単独では機能的であったが、これらを組み合わせると著しく機能を失った。ところが、この組み合わせでも還元剤存在下には部分的に機能を回復した。PomA-G23C (TM I)、PomA-S34C (TM II)、PomA-A178C (TM IV) では PomB-S38C と組み合わせてもこのような機能抑制はみられなかった。PomA-D170C (TM III) と PomB-CLS38C を発現させた膜画分において、約 60 kDa の架橋産物 (XL60) を検出した。この時、ジスルフィド結合した PomA の二量体と PomB の二量体も検出された。XL60 は *fliG* 変異株においても検出された。以上のことから PomA の TM III と PomB が近い位置に存在することが示唆された。また、その相互作用はべん毛基部体が形成されていない状態においても起こると考えられる。

T. Yakushi, S. Maki, D. Yoshimura, Y. Asai, M. Homma : Interaction between transmembrane regions of PomA and PomB, motor proteins of the Na⁺-driven flagella

3P170

Na⁺ 駆動型べん毛モーター膜タンパク質 PomA・PomB 複合体精製の再検討

○小嶋 勝、薬師 寿治、本間 道夫（名大院・理・生命理学）

Vibrio alginolyticus の極毛モーターは Na⁺ 駆動型で、菌体内外の Na⁺ の電気化学ポテンシャル差を利用して回転力を発生している。このモーターのトルク発生に必須の構成因子として、これまでに PomA、PomB、MotX、MotY が同定されている。本研究室で、PomA/B 複合体及び PomA の精製とこれらのプロテオリボソーム中への再構成が行われた。この際、界面活性剤として β -octylglucoside を使い、PomA の N 末端に付加したヒスチジニンググを利用して精製を行った。しかし今回、過去と同様の方法で何度か精製を試みたところ、複合体の回収率が非常に低いことがわかった。また、PomB の C 末端にヒスチジニンググを付加し PomA/B-His₆ を発現する系で精製を試みたところ、PomB は高純度で回収することができたが、PomA の回収率は非常に低く、複合体は得られなかった。そこで、PomA/B 複合体を効率よく精製するために、精製の系の再検討を行った。

いくつかの界面活性剤で PomA/B 複合体の安定性を再検討したところ、Sucrose monocrate を用いると β -octylglucoside に比べ PomA と PomB の解離が少ないことが判明した。そこで、この界面活性剤を用いて PomA/B-His₆ を発現する系で精製を試みた。その結果、Superose 6 カラムでのゲル濾過で、マーカーであるチオグロブリンより大きい、約 900kDa に対応する位置に溶出される PomA/B 複合体と思われるものを得ることができた。PomB 単独でも約 260kDa に対応する位置に溶出された。これらのことから、これまでに考えられている以上に大きな複合体を PomA と PomB が形成するのではないかと思われた。現在、複合体をショ糖密度勾配遠心法で分離しても巨大な見かけの分子量をもつのかを調べている。さらに、この複合体の Na⁺ イオン輸送活性の検出を行う予定である。

M.Kojima, T.Yakushi, M.Homma : Reexamination of purification of the PomA/PomB motor membrane complex from the Na⁺-driven flagella

3P172

Na⁺ 駆動型べん毛モーター蛋白質 MotX と MotY の膜蛋白質としての生化学的性質

○岡部 真裕子、薬師 寿治、小嶋 勝、本間 道夫（名大・院理・生命理学）

海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* の極べん毛は Na⁺ 駆動力により回転する。その回転力発生には、モータータンパク質 PomA、PomB、MotX、MotY が必須である。PomA と PomB は、H⁺ 駆動型べん毛モーター MotA と MotB にそれぞれ相同性を持っているが、MotX、MotY のホモログは存在しない。MotX は Na⁺ チャネル、MotY は固定子であると示唆されているが、それらの機能については未だ曖昧である。去年の本会では MotX と MotY の相互作用を明らかにし、また MotX が MotY の変異を抑制することから機能に重要なものは MotX である可能性を示した。本研究では、MotX と MotY を精製して生化学的に解析を進めることを目的とした。

膜蛋白質である MotX と MotY を生化学的手法による解析を行うために、まず可溶化を試みた。最適なデタージェントを探すために Triton-X100、 β -octylglucoside、sucrose monocrate、CHAPS の 4 種類を使用して、各蛋白質を大量発現させた海洋性ビブリオ菌の膜から可溶化を試みたが、いずれにも MotX は可溶化されなかった。また MotY と共発現させた場合にも影響はなかった。それに対し MotY は単独で可溶性であるのに、MotX と共発現させた場合には可溶化されなくなり MotX と同じ挙動を示した。また MotX の持つ 2 つの Cys 残基 (C56, C87) について、C56S/C87S 二重変異体は野生型と同様に機能的であるが、野生型と比べその量は著しく低下していた。これは Cys を失うことにより不安定になったためだと考えられる。MotX の膜蛋白質としての性質とその安定性や、MotY との相互作用について解析を進めている。

M.Okabe, T.Yakushi, M.Kojima and M.Homma : Biochemical property as the membrane protein of MotX and MotY, components of sodium-type flagellar motor