3P173

Na⁺ 駆動型べん毛モーターの回転計測

○曾和 義幸¹、堀田 博之²、本間 道夫³、石島 秋彦² (¹ 阪大院・基礎工、² 名大院・工、³ 名大院・理)

バクテリアのべん毛モーターは、イオンの流入を回転運動に変換する分子機械であり、H⁺ 駆動型と Na⁺ 駆動型が存在する。Na⁺ 駆動型のべん毛モーターは、外液の Na⁺ 濃度によって回転速度を容易に変化させることができる、特異的阻害剤が存在しトルク発生ユニットの数を変化させることができるなど、モーターの機能解析に適した特徴を持っている。

本研究では、Na⁺ によって駆動される海洋性ビブリオ菌のべん毛モーターの回転運動を計測し、モーターの出力特性を評価することを目的とした。べん毛繊維は直径が約 30nm と非常に細く、直接回転を検出することは難しい。そこで、べん毛繊維にビーズを結合させて、その位相差像を 4 分割フォトダイオードに投影することで、べん毛モーターの回転をナノメートル、ミリ秒の精度で計測を行った。この系では様々な大きさのビーズを用いることで、べん毛モーターにかかる負荷を変化させることが可能であり、高負荷領域での、モーターのトルク・スピードの関係を求めることができた。

以上の実験は、1 方向にしか回転できない変異体を用いて行ったものである。現在、両方向に回転をする菌体を用いて、回転方向が切り替わる瞬間の回転速度変化やモーターに作用する力などの計測を試みている。

Y.Sowa, H.Hotta, M.Homma and A.Ishijima : Measurement of Na⁺-driven flagellar motor rotation

3P175

大腸菌の成長最小長さの検討

○梅原 千慶¹、井之上 一平²、安田 賢二² (¹ 東大・教養、² 東大院・総合文化)

【はじめに】 大腸菌は (2~4) × (0.4~0.7) μm の大きさをした桿菌であるが、この長さは、培養条件によって変化することが知られている。例えば、富栄養条件よりも貧栄養条件の方が短い大腸菌が多く観察される。また、分裂機構に変異を持つために、非常に短い菌 (mini cell) になってしまい、それ以降の増殖能を失ってしまう菌も存在する。この菌は、短すぎるために、必要なコンポーネントが保持できず分裂できないと考えられている。それでは、大腸菌が生命を維持できる最小長さはどの程度だろうか？ 今回我々は、大腸菌が分裂できる最小の長さを求めることを目的として以下の実験を行った。

【実験・結果】 試験管を使い、LB 培地で 7 時間培養した菌の平均長さは 3.5 μm であった。次に、長さの短い大腸菌を作成するために、生理食塩水中で大腸菌を引き続き培養し、一晚培養した菌の平均長さは 3.0 μm に減少していた。ここで、生理的食塩水で培養された菌の最小長さは 1.4 μm であった。

我々は、次に、そのような小さな菌の分裂能の有無を調べるために、微細加工技術を利用した一細胞培養系で細胞を単離培養することで、いろいろな長さの大腸菌の成長・分裂能を検討した。生理的食塩水中で培養された長さ 1.4 μm で成長を停止していた菌を、M9 培地に培養液を戻して培養したところ、130 分後 4.9 μm まで成長し 2.5 μm と 2.4 μm に分裂しさらに成長することが観察された。以上のことから、大腸菌は少なくとも 1.4 μm 以上の長さであれば成長・分裂能を行えることはわかった。本会では、大腸菌の成長速度・分裂能の大腸菌の長さ依存性に着目し、大腸菌の機能維持に必要な最小長さについて報告したい。

S. Umehara, I. Inoue, and K. Yasuda : Minimum length for bacterial growth and division in *E. coli*

3P174

プロトン透過経路としてのべん毛モーターの解析

○上池 伸徳¹、西條 由見子¹、鈴木 博文¹、杉山 滋¹、大澤 研二^{1,2}、難波 啓一^{1,3} (¹ ERATO・難波プロジェクト、² 名大・多元数理、³ 松下・先端技研)

サルモネラ菌はべん毛モーターでらせん形のべん毛繊維を回転させることにより遊泳する。このモーターは細胞膜内外のプロトンの電気化学ポテンシャル差を駆動力としたプロトン流入により回転する。しかしプロトンの流入経路やその時のエネルギー変換についてはまだ判明していない。

本研究はべん毛モーターを構成しているタンパク質がそれぞれどのような形でイオン（プロトン）透過を担っているのかの解明を目指している。今回は大量発現系を使って精製した 2 種類のタンパク質 FliF リング複合体と MotA-MotB 複合体を D Φ P C の人工膜（脂質 2 分子膜）に組み込んだ時の膜コンダクタンス (Gm) 変化について報告する。FliF はべん毛形成において最初に構築される MS リングを構成するタンパク質で、構造形成、タンパク質分泌に重要な役割を果たすだけでなく、回転子の土台ともなっている。また Mot 複合体は固定子でプロトン透過経路とされている。約 2 μg/ml の FliF 複合体を人工膜の両側の水相 (100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH7.5) に添加・攪拌すると数分後に組み込みが始まり最初 20 pS 以下であった Gm が変化を始めて 2 分間で約 1.7 nS と急速に増大した。Mot 複合体 (約 20 ng/ml) の場合は添加・攪拌直後に Gm が増大し始め 2 分後に約 2.4 nS となった。両者共に人工膜は安定であった。Gm 増大後、上から膜材料を塗りつけて膜を厚さ 100 nm 以上にするとう Gm は即座に元に戻り、その後再び 2 分子膜化すると前と同様の Gm 増大が見られた。これは 2 種のタンパク質複合体がそれぞれ脂質 2 分子膜のイオン透過性を増大させることを示している。今後さらにイオン選択性の解析を進めるとともに、C リングタンパク質など他のモータータンパク質の、イオン透過性への影響などの解析を進める予定である。

N.Kami-ike, Y.Saijo, H.Suzuki, S.Sugiyama, K.Oosawa, K.Namba : Analysis of the flagellar motor as a proton-conducting pathway

3P176

滑走バクテリア、マイコプラズマの接着タンパク質の同定

○上野山 敦子、楠本 晃子、宮田 真人 (大阪市大院・理・生物地球)

原核生物 (=バクテリア) であるマイコプラズマ (*Mycoplasma mobile*) は、ガラスや宿主細胞などの固形物の表面に接着し、接着したまま滑るように動く滑走運動を行う。細胞には明らかな極性があり、頭部で固形物の表面に張り付き、頭の方に向かって滑走する。その速度は 2.5mm/s で、毎秒細胞長の 4 倍に値し、最大力は 27pN に達する。細胞表面には他の運動性バクテリアで観察されるべん毛や線毛などの付属物は見られず、滑走運動の機構は全く明らかにされていない。本研究では滑走変異株を解析することにより、滑走に中心的な役割を果たしている接着タンパク質を同定した。我々が取得した 10 の滑走変異株と野生型株の全タンパク質を 3 つの画分に分け、それぞれの画分に含まれるタンパク質を比較したところ、変異株 m13 で欠失しているタンパク質 (P349) が見つかった。遺伝子を同定し、構造を決定したところ、このタンパク質は N 末端近辺に 1 ケ所の膜貫通領域を有し、3,183 アミノ酸からなる 349kD の巨大タンパク質であることが明らかになった。変異株 m13 では P349 の 1,257 番目のグルタミンがストップコドンに置き換わっていた。P349 に対するモノクローナル抗体を取得し、蛍光抗体法と免疫電顕法を用いて局在を調べたところ、P349 は駆動力が出ているように見える、細胞の首部分に局在することが明らかになった。また、このモノクローナル抗体を滑走中のマイコプラズマに加えると、すべてのマイコプラズマがガラスから解離した。これらの結果は、P349 が *M. mobile* の滑走におけるガラス結合を担っていることを示している。

A. Uenoyama, A. Kusumoto and M. Miyata : Identification of adhesion protein of gliding bacteria, *Mycoplasma*.