2C1345

レーザー暗視野顕微鏡を用いたバクテリアべん毛の変形観測 (2)

○西鳥羽 恵美¹、曲山 幸生²、工藤 成史¹ (¹ 桐蔭横浜大学・工、² 食総研)

バクテリアのべん毛はらせん形をしており、船で言えばスクリューにあたる。べん毛の回転数は、毎秒 100 回から、速いものでは 1000 回以上に達する。このように高速で回転するべん毛の変形の観察は、べん毛が極めて小さいことと回転が速いために容易ではなかった。我々は、レーザー暗視野顕微鏡を用いて、べん毛が回転しているときのピッチ (周期) を観察することにした。べん毛を一方向 (べん毛に対して 30° ~ 60°) から照明すると、らせんの一周期に一回ずつ輝点が生じる。高速回転中の輝点を記録するため、CCD カメラの電子シャッターを 1/2000 秒に設定して使用した。このようにして記録したビデオ映像から、輝点の間隔を測り、べん毛のピッチを求めた。昨年は、*Vibrio alginolyticus* YM4 株 (Pof+, Laf-) の遊泳中のべん毛らせんピッチを測定し、100 μ m/s で前進、後退したとき、それぞれ 4% 程度縮んだり、伸びたりするという結果を報告した。今回は、*V.alginolyticus* YM42 株 (Pof+, Laf-, smooth swimming) の菌体がガラスに張り付いた状態で、べん毛回転数とらせんピッチの関係を測定した。回転数が増加すると、ピッチが縮むという傾向が見られた。また、べん毛を垂直方向からレーザーで照明すると一周期に 2 カ所輝点が生じることを利用し、べん毛らせんの振幅も測定する予定である。べん毛回転数とらせんピッチ、振幅の関係を測定し、べん毛全体がどのように変形するのかを明らかにしていきたい。

M.Nishitoba, Y.Magariyama, S.Kudo : Observation of bacterial flagellar deformation with laser dark-field microscope (2)

2C1415

低温電子顕微鏡法によるバクテリアべん毛フィラメントの原子モデル

○米倉 功治^{1,2}、眞木 さおり²、難波 啓一^{1,2} (¹ 阪大・院・生命機能、² 科学技術振興事業団・ERATO・難波プロジェクト)

低温電子顕微鏡法による蛋白質の三次元構造解析では、これまでにバクテリオドプシンや光合成クロロフィル蛋白質複合体等、数 μ m の大きさの二次元結晶を形成する数種類で原子モデルが得られている。いずれも実像と電子線回折を用いて構造解析がなされた。実像のみからの解析では、らせん対称性を利用するもので二次構造の解像可能な 4.6 - 10 Å 分解能、結晶を使用しない単粒子解析法では、正二十面体対称性を利用した球状ウイルスの解析で 7 - 9 Å 分解能が達成されているが、原子モデルが構築できる分解能には至っていない。野生型フラジェリンの一残基変異で得られる直線型バクテリアべん毛フィラメントは、低温電子顕微鏡法による構造解析に適した試料である。液体ヘリウム温度で撮影した右巻き直線型べん毛フィラメントの実像約 100 枚から、らせん対称性を利用して三次元構造の解析を行った。フィラメントの歪み補正、溶媒領域平滑化法を適用し、らせん軸方向に 4 Å 分解能までのデータを含む密度マップを計算した。このマップには、X 線結晶構造解析によるフラジェリンフラグメントの原子モデルには含まれない、フィラメント内側のドメインを形成する両末端部位が解像されている。分子動力学を使った構造精密化プログラム X-PLOR の X 線繊維回折法用の拡張版 FX-PLOR をさらに電子顕微鏡法用に改良し (FEX-PLOR)、フラジェリン全長からなるフィラメントの原子モデルを構築、精密化した。その結果、フィラメント内側の coiled-coil を形成する 2 本の α -ヘリックスが、他のサブユニットと疎水性相互作用し、フィラメントを安定化させていることがわかった。また、フィラメント中央のチャンネルには C 末端側の親水性残基の側鎖が突き出し、輸送されたフラジェリンが細胞質方向へ逆流するのを防ぐラatchet となることが示唆された。

K. Yonekura, S. Maki-Yonekura and K. Namba : Atomic model of the bacterial flagellar filament revealed by electron cryomicroscopy

2C1400

直線型バクテリアべん毛フィラメント (L 型、R 型) の電子線構造解析

○眞木 さおり¹、米倉 功治^{1,2}、難波 啓一^{1,2} (¹ ERATO・難波プロジェクト、² 阪大・院・生命機能)

バクテリアのべん毛フィラメントは、種類のタンパク質フラジェリンがらせん状に重合してできる。野生型フィラメントは通常左巻らせんを形成し束になってスクリューの役割をしているが、モーター急反転に伴いらせん形が右巻きに変わることで束がほぐれ、菌体は方向変換する。このようなフィラメントの柔軟な多型変換メカニズムを解明するためには、野生型フィラメントを構成する二種類の素繊維、L 型と R 型の構造を明らかにすることが必要である。ある種の変異株では L 型あるいは R 型のみからなる直線型べん毛フィラメントを形成する。低温電子顕微鏡法により、この 2 つの直線型べん毛フィラメントの構造解析を行った。液体ヘリウム温度で撮影した像を厳選し、L 型は約 70 本、R 型は約 100 本のフィラメントから、らせん対称性を用いた三次元再構成を行い、7 Å 分解能の密度マップを得た。得られた L 型、R 型フィラメントの電子密度マップに、X 線結晶構造解析から得られたフラジェリンフラグメント (F41) の原子モデル (Samatey et al., 2000) を当てはめ比較したところ、 α -ヘリックス等の二次構造がよく一致した。一方、フィラメント構造安定化に重要なフィラメント内側の領域は、F41 フラグメントには含まれていない。今回の解析によってこの領域が 2 本の α -ヘリックスを形成していることが明らかになった。現在、フィラメントの歪み補正や溶媒領域平滑化をおこない、より詳細な構造の比較を目指している。

S. Maki-Yonekura, K. Yonekura and K. Namba : Structure of the L- and R-type straight flagellar filament from Salmonella by electron cryomicroscopy

2C1430

フック-フィラメント結合蛋白質 HAP3-26K フラグメントの結晶構造と連結モデル

○今田 勝巳^{1,2}、松波 秀行¹、山根 みどり¹、Samatey Fadel¹、長島 重広¹、難波 啓一^{1,2} (¹ ERATO・難波プロジェクト、² 阪大院・生命機能)

細菌の運動器官であるべん毛は、外見上、モーター部の基部体、自在継ぎ手のフック、スクリューの働きをするフィラメントに分類できる。このうち、フィラメントはフラジェリンのらせん状集合体で、ゆるやかな超らせんを形成する。一方、フックはフック蛋白質のらせん状集合体で、モーターの回転力をフィラメントにスムーズに伝えるため、曲げに非常に柔軟且つねじれに対し固い構造を持つ。フィラメントは推進力を発生するためにフックに比べ剛性に富むが、モーターの反転に応答して超らせん形態を変換する柔軟性を併せ持つ。フック-フィラメント間には、フック側に HAP1、フィラメント側に HAP3 の 2 種の HAP 蛋白質複合体があり、フックとフィラメントを連結している。力学的特性が著しく異なる両者を接続する機構を理解するため、単量体でフレキシブルな NC 末端領域を除去した HAP3 26K フラグメント (FL26) の結晶構造解析を 1.9 Å 分解能で行った。FL26 は、フラジェリンの D1 ドメインに β -ターン- β の羽をつけたようなドメイン 1 個から成る。FL26 とフラジェリンの構造類似部分である 2 本の N 末端ヘリックスと C 末ヘリックスの主鎖原子は、互いに r.m.s.d が 1.3 Å で重なることができた。フラジェリン D1 ドメインとの構造類似性を利用し、べん毛フィラメントモデルに FL26 を当てはめ、べん毛繊維中のモデルを作成したところ、 β -ターン- β によるジグザグベルト構造がフィラメントを取り巻くようにできることがわかった。この構造は、フック蛋白質の素繊維相互作用に重要な働きをする構造部分と非常によく似ている。この構造から、力学的性質の異なる両者がうまく繋ぎ止められているしくみが明らかになった。

K.Imada, H.Matsunami, M.Yamane, F.Samatey, S.Nagashima and K.Namba : Crystal structure of HAP3-26K, a flagellar hook-filament junction protein, and a junction model