2C1445

Atomic structure of FlgE-32k, a majore fragment of the hook protein

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

Bacterial flagellum is a helical propeller by mean of which bacteria swim. The motor located at its base rotates the flagellar filament. Between the flagellar filament and the motor is a short, highly curved and flexible rod segment, called hook, which transmits the torque of the motor to the filament. The hook functions as an universal joint. The hook is a helical assembly of a single protein, FlgE. Similarly to the flagellar filament, the hook has a tubular structure composed of 11 protofilaments. In every revolution of the motor, each protofilament is thought to undergo a cycle of conformational changes.To understand the universal joint mechanism of the hook, the high resolution structure of FlgE is needed. FlgE is very difficult to crystallize because of its high propensity to polymerize. Therefore, we expressed a 32 kDa fragment of hook protein, FlgE-32k, which lacks 70 and 30 residues of the N- and C-terminus, respectively. FlgE-32k was successfully crystallized and the crystal structure has been solved at 1.8resolution.Flge-32k structure consists entirely of beta-strands connected by short loops and turns. Two of the three domains of FlgE are clearly identified. The atomic structure of FlgE-32k helps us to understand the interactions within a protofilament and between protofilaments in the hook.

F.Samatey, H.Matsunami, K.Imada, S.Nagashima and K.Namba : Atomic structure of FlgE-32k, a majore fragment of the hook protein

2C1515

サルモネラ菌のべん毛ロッドの形成順序

○相沢 慎一¹、浅野 裕子¹、大崎 由紀子¹、ヒューズ ケリー² (¹ 帝京大学理工学部バイオサイエンス学科、² ワシントン州立大学)

バクテリアのべん毛モーターの回転軸であるロッドは4種類の似たような低分子量タンパク質 (FlgB, FlgC, FlgF, FlgG) と役割不明の FlhE からできている。たかだか長さ 50nm のロッドを作るのに、なぜこんなにもたくさんのタンパク質が必要なのか？フックに一番近い部分が FlgG からできていること以外は、これらのタンパク質がどのように配置されているのか不明である。また、これらのタンパク質のうちどれが欠けてもロッドが形成されないことから、ロッドは単純な棒状ではなくもっと複雑な構成をしていると考えられる。我々はロッドの構造および形成過程を明らかにする目的で、以下の実験を行った。T-POP 株はプラスミドに任意の遺伝子を組み込み、テトラサイクリン (Tet) の添加によって一斉にそのタンパク質が発現できるように工夫された菌である。べん毛欠損株にその欠損遺伝子を組み込んだ T-POP 株を作成した。Tet 添加後、ある時間の後に徐々に運動性をもつ菌が増え、しばらく後にはほぼすべてが泳ぐようになった。これら非同調菌は細胞周期のすべての状態を含むため、菌が泳ぎ始めた時点を新規増幅タンパク質が構造に組み込まれた最短時間と考えることができる。 ロッド遺伝子を組み込んだ T-POP 菌を解析した結果、Tet 添加後 24 分で flgC 変異体が動き始めた。同様に、FlgE 株は 20 分、flgB 株は 18 分、flgG 株は 16 分であった。これらの結果から、ロッドの形成順序は FlgC → FlhE → FlgB → FlgG であることが示された。FlgF 株については現在解析中である。これと平行して行った生化学的実験の結果も合わせて報告する。

S.-I.Aizawa, Y.Asano, Y.Ohsaki, K. Hughes : Formation of the flagellar rod in Salmonella

2C1500

べん毛フックキャップ蛋白質 FlgD の複合体形成の解析

○松波 秀行¹、難波 啓一^{1,2} (¹ERATO・難波プロジェクト、² 阪大院・生命機能)

べん毛フックキャップ蛋白質 FlgD はフックの構築に必須で、べん毛特異的輸送装置によって細胞内からロッドの先端に運ばれ、先端に結合してキャップ構造を構築する。このキャップは、後からに運ばれてくるフック蛋白質、FlgE によるフックの伸張を開始し促進するが、フックの完成とともに送られてくる HAP1 に置き換えられて先端から解離する。一方、べん毛フィラメントでは、その先端に HAP2 がキャップ構造を形成し、フラジェリンの自己集合を促進してフィラメントの伸張を助ける。HAP2 が5 量体を形成し、フィラメントの 5.5 回対称に近いらせん構造との対称性ミスマッチを利用して機能することから、同様のらせん構造を持つフックの先端で、FlgD も HAP2 と類似の複合体を形成することが期待され、FlgD とフックの複合体がフックの伸張モデルを考える上でも重要な役割を担っていると予想される。そこで我々は、FlgD のキャップ構造を詳細に調べるために、サルモネラ菌のゲノム DNA より目的の遺伝子を PCR 法により増幅し、タンパク質発現用プラスミドを構築した。得られたプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、FlgD の発現誘導を行った。菌体を超音波破碎して得られた粗抽出液の超遠心分離を行ったところ、FlgD は可溶性画分として回収された。引き続きイオン交換クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーにて分離後、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。その際、FlgD は単量体と比較的均一なサイズの多量体が混在していることが明らかになった。分析型超遠心による解析からも同様の結果が得られた。したがって、この多量体がフック伸張時のキャップ構造の機能単位である可能性が示唆された。現在、生化学的手法や電子顕微鏡による観察から、FlgD の複合体形成を解析中である。

H.Matsunami and K.Namba : Self-Assembly of Flagellar Hook Capping Protein FlgD

2C1545

赤痢菌のタイプIII タンパク質分泌系の構造機能解析

○小森谷 薫¹、ブロッカア アリエル¹、相沢 慎一² (¹ オックスフォード大学病原性研究所、² 帝京大学理工学部バイオサイエンス学科)

赤痢菌 (*Shigella flexneri*) はタイプIII タンパク質分泌系を用いて、病原性因子イパ (Ipa) タンパク質を宿主細胞へ注入し、宿主の細胞骨格を変化させて侵入を果たす。これらの病原性因子の分泌は *in vivo* では宿主細胞との直接接触 (コンタクト) によって促されるのが一般的であるが、*in vitro* 系として Congo Red の添加により引き起こされることが以前から知られている。赤痢菌では、宿主細胞への侵入、宿主細胞内での菌の拡散などに関して現在もっとも研究が進んでいるサルモネラ菌の系とは多くの部分で異なっている。しかし、タイプIII タンパク質分泌装置および病原性因子に関する限り、ともに種を超えて機能的・構造的に高い相同性をもっている。宿主細胞とのコンタクト初期過程において、IpaA・IpaB・IpaC・IpaD・IpgD の5 種類の病原性因子がメジャーなタンパク質として細胞外に分泌されることがすでに分かっており、これらのタンパク質の機能の解析が進んでいる。本実験では、病原性因子イパタンパク質が初期過程においてどのように分泌されるのかを分泌量のタイムコースを取って定量的に調べた。そして、タイプIII タンパク質分泌装置1 個あたりの病原性因子分泌量・貯蓄量を推測した。これまで、感染初期の病原性因子の分泌は、Co-translational secretion によるものか、Post-translational secretion によるものか議論が繰り返されてきたが、本実験の結果を踏まえて新しい議論を展開する。

K.Komoriya, A.Blocker, S.-I.Aizawa : Structural and functional analyses of the typeIII secretion system in *Shigella flexneri*.