3E0900

Na⁺ 駆動型べん毛モーターのイオン透過蛋白 PomAB の大量精製

○渥美 龍男¹、小嶋 勝²、薬師 寿治²、本間 道夫²、米倉 功治^{1,3}、上池 伸徳¹、大澤 研二^{1,4}、難波 啓一^{1,3} (¹ 科技団・ERATO・難波プロジェクト、² 名大院・理・生命理学、³ 阪大・院・生命機能、⁴ 名大・多元数理)

細菌べん毛モーターは膜を介した H⁺ 又は Na⁺ の電気化学的ポテンシャルエネルギーを回転という力学的仕事に変換している。この機構を知るには入力であるイオン透過の仕組みを調べることが重要である。海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* の Na⁺ 駆動型極毛モーターでは、PomA/B 複合体が Na⁺ を透過しトルク発生に関与していると考えられる。これまでに PomA 欠損株で His₆-PomA を発現し、Octylglucoside で His₆-PomA/B 複合体を可溶性精製し、プロテオリボソームに再構成し ²²Na⁺ の取り込み活性を測定した報告がある。しかし、この条件では、PomA/B 複合体の収率が 0.08 μg protein/L culture と低い。ため、精製系の再検討を行っている。昨年の年会で小嶋らが PomA/B 欠損株で PomA/B-His₆ を発現し精製した場合、Octylglucoside より Sucrose monocrate の方が Ni²⁺ カラムから溶出時に複合体の解離が少ない事を報告している。さらに他の界面活性剤を検討したところ、CHAPS を用いると複合体の解離がより少ないことが分かったので報告する。PomA/B-His₆ 発現膜を 2.5 % CHAPS で可溶性化し、Ni²⁺ カラムで精製後、限外濾過で濃縮し Superdex200HR10/30 でゲル濾過した結果、500kDa 付近に PomA/B-His₆ 複合体を得た。この方法による収率は 500 μg/L culture で初期の方法の 6600 倍であった。SDS-PAGE で PomA、PomB と共に PomA 二量体が検出されたが、透析法でプロテオリボソームに組み込んだ後には PomA 二量体は検出されなかった。そこで、複合体のサイズが小さくなる事を期待し、溶液に E. coli Polar Lipid extract 100 μg/ml を加え同じ方法で精製したが、ゲル濾過の溶出パターンや SDS-PAGE にほとんど違いはなかった。現在、²²Na⁺ の取り込み活性の測定や人工膜の系で電流計測を試みている。

T. Atsumi, M. Kojima, T. Yakushi, M. Homma, K. Yonekura, N. Kamiike, K. Oosawa, K. Namba. : Large scale purification of PomAB, the ion conducting proteins of the Na⁺-driven flagellar motors.

3E0930

Na⁺ 駆動型べん毛モーター構成因子 FliG の C 末端領域に保存された荷電残基の解析

○依光 朋宏、薬師 寿治、本間 道夫 (名大・院理・生命)

細菌べん毛の回転はイオン流をエネルギー源としているが、その回転力発生機構は解明されていない。大腸菌 H⁺ 駆動型べん毛モーターでの研究より、回転子 FliG と固定子 MotA 間の荷電アミノ酸残基を介した相互作用がトルク発生過程に重要であるという静電的相互作用モデルが提唱されている。しかし *V. alginolyticus* の Na⁺ 駆動型モーターの固定子 PomA で保存されている荷電残基に変異を導入してもモーターは機能的であった。一方、大腸菌 FliG (eFliG) のトルク発生に重要な C 末端領域の荷電残基 K264、R281、D288、D289、R297 も *V. alginolyticus* FliG (vFliG) で K284、R301、D308、D309、R317 として保存されている。本研究では、それらの荷電残基へ変異導入を行い Na⁺ 駆動型モーター vFliG のトルク発生におけるこれらの残基の役割を調べた。

それぞれの荷電残基を Ala に単独で置換した変異体 vFliG は eFliG の場合と同様に機能した。次に二重変異を導入したが、eFliG では完全に機能を失う R301A/D308A、R301A/D309A を含めすべての置換体は機能的であった。さらに R301A/D308A/D308A、R301A/D308N/D308N 置換体もそれぞれ野生型 FliG の約 20%、40% の運動能を示した。以上の結果より H⁺ 駆動型モーター FliG の静電的相互作用に必要な荷電残基は *V. alginolyticus* の Na⁺ 駆動型モーターの回転には必ずしも必須ではないと考えられる。次に *V. cholerae* の結果をもとに N 末端が vFliG、C 末端が eFliG で構成されるキメラ veFliG を作成した。veFliG は vFliG と同レベルで *flg* 株を相補した。vFliG では機能的であるが eFliG では機能を欠損させる変異 D308N/D309N を veFliG に導入すると著しく機能が阻害された。このことは保存された荷電残基と協調的に働く残基が vFliG には存在する可能性を示唆する。

T. Yorimitsu, T. Yakushi and M. Homma : Conserved charged residues in the C-terminal region of FliG, a component of the Na⁺-driven flagellar motor

3E0915

Na⁺ 駆動型べん毛に特異的なモータータンパク質 MotX と MotY の外膜局在

○岡部 真裕子、薬師 寿治、小嶋 勝、本間 道夫 (名大・院理・生命理学)

細菌は特定イオンの電気化学的ポテンシャル差を利用し、べん毛をスクリューのように回転させて遊泳する。大腸菌やサルモネラ菌のべん毛は H⁺ であるのに対し、海洋性ビブリオ菌の極べん毛は Na⁺ を利用して回転する。ビブリオ菌の Na⁺ 駆動べん毛では PomA、PomB、MotX、MotY の 4 つのタンパク質が回転力発生に必須である。PomA と PomB は H⁺ 駆動型モーターの MotA と MotB とそれぞれ相同性を持っているが、MotX と MotY は相同性を持つものは見つからず、機能も明らかになっていない。

去年の年会において、それまで内膜に存在すると考えられていた MotX と MotY が外膜に局在することを報告した。その後、これらの外膜タンパク質としての性質を解析した。まず、N 末端の配列を決定したところどちらも翻訳開始点から 2 2 番目のアミノ酸から始まっており、2 1 番目までの配列は輸送シグナルであることが明らかになった。また MotX と MotY は共発現させたとき外膜に局在し、互いに安定に存在した。単独発現の場合 MotY は外膜に局在したが、MotX は内膜とも外膜とも異なる挙動を示した。一方、PomA、PomB、MotX、MotY を共発現させた膜では、PomA と PomB は内膜に含まれるのに対し MotX と MotY は外膜に局在していた。またこのとき一部の MotX が内膜にも存在していた。これらのことから MotX が内膜と外膜両方に含まれる可能性などが考えられる。アミノ酸配列の二次構造予測でも多くの外膜タンパク質がとるような β シート構造は見られず、MotX が外膜表在性のタンパク質である可能性を示唆している。MotX と MotY の外膜局在とモーター内での役割について議論したい。

M.Okabe, T.Yakushi, M.Kojima and M.Homma : Outer membrane localization of MotX and MotY, specific components of the sodium-driven flagellar motor

3E0945

モータータンパク質 PomA 細胞質領域の Na⁺ 駆動型べん毛の回転力発生に必要なアミノ酸残基

○福岡 創、薬師 寿治、依光 朋宏、本間 道夫 (名大院・理・生命理学)

V. alginolyticus の極べん毛は、Na⁺ の電気化学ポテンシャル差を利用し回転する。その回転力発生には必須な因子として PomA、PomB、MotX、MotY という 4 つのモータータンパク質 (固定子) が同定されている。H⁺ 駆動型べん毛モーターの研究から、固定子 MotA の細胞質領域と回転子 FliG の荷電アミノ酸残基同士の静電相互作用が、べん毛の回転力発生に重要であるというモデルが提唱されている。*V. alginolyticus* では、MotA の相同因子 PomA にその荷電アミノ酸が保存されているにもかかわらず、これらの残基およびその周辺の残基を中性化した変異体 (R88A/K89A/E96Q/E97Q/E99Q, 以下 AAQQQ) はべん毛の回転は正常であった。そこで本研究では、FliG との相互作用に重要とされる PomA の細胞質領域について、回転力の発生に重要な残基を検索した。

PomA 細胞質領域には AAQQQ で中性化した残基以外にいくつかの荷電残基が保存されている。AAQQQ 変異体にこれらの残基を中性化する変異を導入しても PomA は機能的であった。また演者らは PomA のランダム変異導入から、細胞質領域への二重変異の導入により運動能を失う変異体を報告していた。これらの二重変異を単独で導入すると、R135Q あるいは H136Y 変異により PomA は機能を失うことが分かった。また L131F と T132M が二重変異で導入されると PomA は機能を失うが、これらの変異を単独で導入しても機能は保持されていた。しかし AAQQQ 変異体へ L131F あるいは T132M 変異を単独で導入すると、運動能が著しく低下することが分かった。これらの残基の変異による運動能の変化が、PomA-FliG 間相互作用の変化に起因しているのではないかと考え検討している。

H. Fukuoka, T. Yakushi, T. Yorimitsu, M. Homma : The critical amino acid residues of cytoplasmic region of PomA for the rotation of Na⁺-driven flagella