B501

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* DJ2 株のべん毛構造と分泌タンパクの解析

○平野 貴謙¹、南澤 究²、相沢 慎一¹ (¹JST, CREST、²東北大院、生命科学)

根粒菌は植物の根に寄生し根粒を形成する。ゲノム配列解析が進む中、動物および植物の病原菌病原性に広く使用されている TypeIII 輸送系 (TTSS) 相同性遺伝子群が根粒菌の Nod 共生領域内に見いだされてきている。同時に、べん毛遺伝子群も存在することがわかってきている。しかしながら、現在までに根粒菌の TTSS 構造体は発見されていない。また、腸内細菌に比べ土壌細菌の TTSS およびべん毛の生理的役割はほとんどわかっていない。一方で、根粒形成における根粒菌と植物間の相互作用に TTSS とべん毛による運動性が関与していることは、植物病原菌の過敏反応の例などからも想像できる。そこで本研究においては、昨年その全ゲノム配列が同定されたダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 DJ2 株を用い培地中分泌タンパクの解析を試みた。まず、ゲノム配列から決定された TTSS およびべん毛関連タンパクの物理化学的性質を他の生物種のそれらと比較することにより、アノテーションの再検討を行った。1 セットの TTSS 遺伝子群が Nod 共生領域内に、2 セットのべん毛遺伝子群が別個にクラスターを形成していた。暗視野顕微鏡では TYC 培地中で 10% 程度の遊泳菌体を確認でき、電子顕微鏡では極毛 1 本と側毛 2 本を観察できた。さらに様々な培地条件における分泌タンパク量の変化を観察した。TY 培地に CaCl_2 を添加すると、150mM 付近をピークとして 32kDa、20kDa、15kDa タンパクの分泌が誘導された。32kDa のタンパクについてはその分子量からフラジェリンと考えられるが、同条件下での遊泳菌体数は CaCl_2 非添加の場合と比較して違いが見られなかった。現在培地条件によって分泌量の変化がみられたタンパクについて N 端アミノ酸配列を決定することによりその同定を進めている。

T. Hirano, K. Minamisawa and S. Aizawa : Analysis of the flagellar structure and secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum* DJ2

B503

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の 2 種類のべん毛と運動性

○谷ヶ崎 仁¹、南澤 究²、相沢 慎一¹ (¹CREST, JST、²東北大院、生命科学)

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* は有鞘の極毛 1 本と 2 本の無鞘側毛の合計 3 本のべん毛を形成する。本研究の目的は、このバクテリア *B. japonicum* の 2 種のべん毛の構造および機能を調べることである。また、これらべん毛の発現レベルの制御と菌体の成長および環境への適応能力との関係をも考察する。まず、培養条件と運動性の関係を調べた。含カルシウム栄養培地 TYC 中で 26℃、5 日から 1 週間培養すると対数増殖期に達し、その時の運動率は約 20% であった。5% マニトールを加えた TYC 中では運動率は 0% であった。マニトールがどのようにしてべん毛遺伝子発現を抑制しているのか、わかっていない。また、糖のない最小培地中ではその運動率は約 50% に上昇した。この菌体は極毛だけをもっていることが電子顕微鏡観察からわかった。ゲノム解析から、これら 2 種のべん毛は別々の遺伝子群によってコードされていることがわかった。そして、そのうち極単毛の生成に関与していると思われる遺伝子群は、同じ α -プロテオバクテリアに属する *Caulobacter crescentus* のべん毛遺伝子群と遺伝子の種類やオペロンの構成が極めて類似していた。また、増殖が定常期に入ると培地中に無数のべん毛が放出されることが顕微鏡観察からわかったが、このべん毛放出が自発的なものかどうか現在調べている。

J. Yagasaki, K. Minamisawa and S. Aizawa : Two Distinct Flagella of *Bradyrhizobium japonicum* and Its Motility

B502

サルモネラ菌べん毛特異的輸送装置タンパク質 FlhA の細胞質ドメインの構造特性と結晶化

○西條 由見子¹、南野 徹¹、今田 勝巳^{1,3}、古川 進朗¹、Robert Macnab²、難波 啓一^{1,3} (¹JST・ICORP・超分子ナノマシン P、²Yale Univ. MB&B、³阪大院・生命機能)

サルモネラ菌べん毛が成長する際、軸構造を形成しているタンパク質は、細胞質内で合成された後、べん毛の細胞質側にあるべん毛特異的輸送装置によって細胞膜を通過し、成長端まで運ばれて重合する。FlhA は輸送装置を構成するタンパク質の一つで、そのアミノ酸配列から細胞膜貫通ドメインと細胞質ドメインの二領域に分けられる。それぞれのドメインが他の輸送装置タンパク質と相互作用してタンパク質輸送に関わると考えられているが、詳細は明らかになっていない。今回、FlhA の細胞質ドメイン (FlhAc) の構造特性について調べたので報告する。

N 末端に His-tag を修飾した FlhAc (His10-FlhAc, 43kDa) を大腸菌大量発現系から精製し、ゲルろ過と超速心分析による解析を行った。その結果、His10-FlhAc の大部分は単量体として、一部は二量体として存在していた。Trypsin と V8 による限定分解実験の結果、His10-FlhA は His-tag を含む N 末端側約 40 残基が分解されるのみで、非常に安定した構造をとっていた。限定分解により得られたフラグメント FlhAc38k (38kDa) と Enterokinase により His-tag を除去した FlhAc (40kDa) は二量体を形成しないことがわかったので、His10-FlhAc の二量体形成は His-tag の相互作用によるものと考えられる。FlhAc38K の円二色性スペクトルによる構造解析を行ったところ、FlhAc38K は α ヘリックスの含有率の高い構造をとっていることがわかった。His10-FlhAc と FlhAc38K の結晶化を試みたところ、ともにいくつかの条件下で結晶を得ることができたが、どれも再現性に乏しい。現在、構造解析に適した結晶を得るため、精製条件と結晶化条件を再検討している。また、FlhAc38K の機能解析も行っており、その結果についても報告する予定である。

Y.Saijo-Hamano, T.Minamino, K.Imada, Y.Furukawa, R.Macnab, K.Namba : Structural properties and crystallization of cytoplasmic domain of FlhA, a component of the flagellar export apparatus of Salmonella

B504

直線型バクテリアべん毛フィラメント (L 型) の極低温電子顕微鏡による構造解析および R 型フラジェリンとの比較

○眞木 さおり¹、米倉 功治^{1,2}、難波 啓一^{1,2} (¹ 科技団・ICORP・超分子ナノマシンプロジェクト、² 阪大院・生命機能)

バクテリアべん毛フィラメントは、一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、数本が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、菌体は方向変換をする。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。変異株で、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ものがあり、L 型、R 型でのフラジェリン分子の構造および隣り合うサブユニット間での相互作用を明らかにするため、極低温電子顕微鏡による構造解析を行った。R 型については、らせん対称性を利用した三次元再構成を行い、フィラメントの歪み補正、溶媒領域平滑化法を適用し、約 4 Å 分解能までのデータを含む密度マップを計算し、原子モデルの構築を行った (米倉、眞木、難波、Nature in press)。今回、L 型について構造解析を行った。液体ヘリウム温度で撮影した約 50 本のフィラメント像について、らせん対称生を用いた三次元再構成を行い、7 Å 分解能のデータを含む密度マップを得た。このマップに R 型フラジェリンの原子モデル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。より詳細な構造の比較を行うためにはより分解能の高いマップが必要である。そこで L 型でも R 型同様、フィラメントの歪み補正や溶媒領域平滑化を行い、原子モデルの構築を目指している。

S. Maki-Yonekura, K. Yonekura and K. Namba : Comparison of the L- and R-type flagellin structure in the filament revealed by electron cryomicroscopy