B505

polyhook mutant を用いた mot 遺伝子の発現時期の解明

○小川 剛史¹、高橋 則子²、相沢 慎一¹ (¹JST, CREST、²宇都宮大 農)

多くのバクテリアはべん毛を持つが、その構築の過程では 50 近い遺伝子が段階的に発現し、部品等を形成していく。べん毛はその根元にモーター構造を持ち、フィラメントをスクリューのように回転させることによって泳いでいる。べん毛自身が回転していることを初めて明らかにしたのは *E.coli* の polyhook mutant を用いた tethered cell 法であった。polyhook mutant とは *fliK* 遺伝子に mutation が起こり、べん毛の代わりに異常な長さの hook ができる株のことである。一方、べん毛モーターの回転には Mot と呼ばれるタンパク質が必要である。ところが、GFP を用いて *E.coli* のべん毛遺伝子の転写活性を解析した S.Kalir, J.McClure らの論文 (SCIENCE(2001), 292: 2080-2083) によると、*mot* 遺伝子は 3 段階ある中での最終段階で発現するとされ、3 段階目は 2 段階目の hook が完成してから発現を開始する。そして *fliK* 遺伝子は 2 段階目に属していると言う。このことから、3 段階目の遺伝子発現が行われない (すなわち Mot タンパク質のない) はずの polyhook mutant は回転しないことになる。本実験の目的は、いつ Mot タンパク質がつくられ、そしていつバクテリアのべん毛モーターが回転可能となるのか、という点をあらためて探ることにある。そこで *Salmonella typhimurium* の 20 種の polyhook mutant を、hook 抗体を用いて tethered した。Tethered する方法として、90 μ l 程度の容量を持つスライドガラスに菌体懸濁液をのせ、そこに抗体を塗ったカバーガラスをかぶせて、一定時間経過した後のカバーガラス表面に付着した菌体の観察を行った。その結果、polyhook mutant 20 株のうち 17 株が回転し、残り 3 株は回転しなかった。これらの株の分泌タンパク質を解析することで、3 段階目の遺伝子 (Mot やフラジェリン遺伝子) の発現における *fliK* の役割を探る。

T.Ogawa, N.Takahashi and S.-I.Aizawa : When does the flagellar motor start rotating?

B507

Caulobacter crescentus の自発的べん毛放出のしくみ

○神戸 正臣¹、相沢 慎一²、Jenal Urs³、嶋田 勝彦¹ (¹名古屋市立大学院、²CREST,JST、³パーゼル大学バイオセンター)

Caulobacter crescentu は非対称細胞分裂により形態の異なる 2 種類の娘細胞を生じる。ひとつは極に 1 本のべん毛をもつ swarmer cell、もうひとつは粘着性の stalk と呼ばれる突起物をもつ stalked cell である。Swarmer cell はある時点で積極的にべん毛を放出し、その跡から stalk を形成し stalked cell へと変換していく。また、stalked cell が成長するにつれて stalk と反対側の極に新しいべん毛が形成され、それは細胞分裂後 swarmer cell となる。*C.crescentus* のこの積極的なべん毛放出のため、特殊なしくみがべん毛基部にあると考えられている。たとえば、他の菌体とは異なり P リングと MS リングの間に E リングと呼ばれる余分なリング構造があって、この E リングがべん毛放出に大きくかかわっていると主張するグループもある。また、べん毛放出とはほぼ同じ段階でべん毛基部体の固定子である MS リングがタンパク分解することが報告されている。MS リングがべん毛放出の決定的な要因とされています。そこで私たちは *C.crescentus* のべん毛基部体構造を精製し、その生化学的特性を調べることにした。私たちの精製したべん毛基部体は *S.typhimurium* のべん毛基部体と非常によく似ており、E リングを確認することができなかった。しかし、*C.crescentus* のべん毛構造には *S.typhimurium* と比較して高塩濃度や pH などの物理化学的処理に対して弱いことがわかった。また、精製したべん毛基部体を trypsin や chymotrypsin あるいは pronaseE などによって処理をしたところ、その一部またはすべてのリングが解けることが電子顕微鏡観察によって明らかになった。自発的に放出されたべん毛は filament と hook そして rod 構造からなる。タンパク質酵素によって処理をしたべん毛構造も自然に放出されたべん毛とよく似ていることから、この積極的べん毛放出には細胞膜に埋まったタンパク質分解酵素が関与していると考えられる。

M.Kanbe, S.Aizawa, U.Jenal and K.shimada : Mechanism of the flagella ejection in *Caulobacter crescentus*

B506

サルモネラ菌の運動性に及ぼされるべん毛モーター蛋白質複合体 MotA/B のマルチコピー効果

○南野 徹¹、曾和 義幸²、西條 由見子¹、杉山 滋³、石島 秋彦^{2,4}、大澤 研二⁵、難波 啓一^{1,6} (¹ 科技団・ICORP・超分子ナノマシン、² 名大院・工学、³ 食総研、⁴ 科技団・PRESTO、⁵ 群大院・工学、⁶ 阪大院・生命機能)

サルモネラ菌の運動器官であるべん毛は、プロトン駆動型回転モーターで、MotA、MotB、FliG、FliM、および FliN の 5 種類の蛋白質がべん毛モーターの回転力発生に関与する。プロトン流を回転力に変換するモーター蛋白質 MotA と MotB は細胞膜内で複合体を形成し、固定子として働く。モーターの回転方向を制御するスイッチ蛋白質 FliG、FliM、および FliN は、MS リングの細胞質側に C リングを形成し、回転子および反転制御装置として機能する。回転力は MotA と FliG との間の静電的相互作用により発生すると考えられているが、エネルギー変換に伴うべん毛モーター回転の分子機構については明らかではない。

べん毛モーターの回転機構を解明するには、MotA/B 複合体に流れ込むプロトンを直接測定する必要がある。以前の研究から、べん毛モーターが 1 回転するのに必要なプロトンの数は約 1000 個と推定されている。しかしながら、MotA/B 複合体のプロトン透過活性については未だきちんと測定されておらず、さらに、その複合体がべん毛モーターの他の構成因子非依存的にプロトンを流すことができるか否かは明らかではない。今回、サルモネラ菌の運動性に及ぼされる MotA/B 複合体のマルチコピー効果を調べた。

MotA/B 複合体の大量発現により、サルモネラ菌のスワーム形成が著しく阻害された。MotA/B 複合体を大量発現させても、細胞増殖、べん毛形成、およびべん毛モーターのトルク発生には全く影響が見られなかったが、野生型で反時計回り (CCW) にバイアスしているモーターの回転方向が、時計回り (CW) にバイアスされた。そして、その原因が細胞内 pH の変動に伴う走化性反応によるものと示唆された。これらの結果に基づき、MotA/B 複合体のプロトン透過活性について議論する。

T. Minamino, Y. Sowa, Y. Saijo-Hamano, S. Sugiyama, A. Ishijima, K. Oosawa and K. Namba : Multicopy effect of the MotA/MotB complex on the motility of *Salmonella*

B508

フラジェリンとその特異的輸送タンパク質 FliS 間の相互作用解析

○古川 進朗¹、Samatey Fadel A.^{1,2}、今田 勝巳^{1,2}、難波 啓一^{1,2} (¹ 科学技術振興事業団・ICORP、² 阪大院・生命機能)

細菌の多くは数本のべん毛をもち、これをスクリュープロペラとして回転させることで自由に泳ぎ回る。べん毛は大きく分けて、モーターの役割を果たす基部体、モーターで生じたトルクを潤滑に伝達するフック、伝達されたトルクを推進力に変換するらせん型フィラメントから構成されている。フラジェリンは、このらせん型フィラメントを形成するタンパク質である。以前我々は、フラジェリンにべん毛構成タンパク質の 1 つである HAP3 の β アミロイド線維化を促進する機能があり、この機能の活性状態と不活性状態間の変化が、フラジェリン C 末端領域の熱安定な 2 つの局部構造間のスイッチングに起因していることを明らかにした。しかし HAP3 のアミロイド化はべん毛の構造、機能のどちらにも全く関係ない現象であり、この局部構造変化がべん毛でどのような役割を果たしているのかは不明である。最近、フラジェリンと、その特異的輸送を促進する分子シャペロン FliS 間の相互作用に、このフラジェリンの C 末端領域の局部構造の違いが影響しているのではないと思われる結果が、予備実験から得られた。フィラメント末重合のフラジェリンと、フィラメントを脱重合して得たフラジェリンの局部構造が、この 2 種類の C 末端構造に対応していることから、この部分が細胞内での輸送時、あるいはべん毛構築時に関与している可能性がある。本年会ではフラジェリンと FliS との相互作用解析の詳細な結果を紹介する予定である。

Y.Furukawa, F.A.Samatey, K.Imada, K.Namba : Interaction between flagellin and FliS, flagellar export chaperon, from *Salmonella typhimurium*.