B509

Vibrio alginolyticus における CheY による二つのべん毛システム制御

○小嶋 勝、薬師 寿治、川岸 郁朗、本間 道夫（名大院・理・生命理学）

Vibrio alginolyticus は Na⁺ 駆動型である極べん毛と H⁺ 駆動型である側べん毛の二種類のべん毛を持つという興味深い細菌である。常に作られている極べん毛は低粘性の液体中の移動に適しているのに対し、側べん毛は個体表面上や高粘性の液体中の移動に用いられる。それぞれ一方しか持たない変異株を用いた解析から、極べん毛による運動も側べん毛による運動も走化性応答を示し、誘引物質としてセリン、忌避物質としてフェノールがわかっている。大腸菌やサルモネラ菌の走化性の情報伝達においては、ヒスチジンキナーゼである CheA、レスポンスレギュレーターである CheY が中心的な役割を果たしている。*V. alginolyticus* も同様のシグナル伝達系を用いていると考えられているが、二種類のべん毛が共に、同一の Che タンパク質によって制御されているのであろうか。

昨年の年会では、PCR を用いて *V. alginolyticus* の *cheY* 遺伝子のクローニングを行い、クローニングした遺伝子が、大腸菌の *cheY* 変異を相補したことを報告した。今回、この *V. alginolyticus* の CheY を *V. alginolyticus* 野生株中で大量発現し、顕微鏡下で極べん毛、側べん毛の走化性応答を調べたところ、2つのべん毛は共に忌避応答と似た運動をし、セリンに応答しなくなった。このことから2つのべん毛は共通の CheY の制御を受けていると考えられる。しかし、リン酸化部位をなくした変異型 CheY(D60A) を作成し大量発現させたところ、極べん毛がセリンに応答するのにに対して側べん毛は応答しないという結果を得た。この結果から2つのべん毛は共通の CheY により制御されるが、その機構は異なっている可能性も考えられ、現在さらに解析中である。

M.Kojima, T.Yakushi, I.Kawagishi, M.Homma : CheY participates in regulation of two different flagellar systems in *Vibrio alginolyticus*.

B511

コレラ菌の5つの CheY 相同タンパク質の機能解析—CheY3のみが走化性に関与する

○百武 晃宏、本間 道夫、川岸 郁朗（名古屋大・院・理・生命・感覚運動）

細菌は走化性によって生存や増殖に適切な環境へ移動する。そのシグナル伝達系の中心は、膜貫通型受容体によって調節される His キナーゼ CheA から応答調節因子 CheY への His-Asp リン酸リレーである。リン酸化型 CheY は鞭毛モーターに結合してその回転方向を逆転させる。コレラ病原細菌 *Vibrio cholerae* は、走化性関連遺伝子 (*che*) クラスターを3つもつ。クラスター I は *cheA1*、*cheY1*、*cheY2*、II は *cheA2*、*cheY3*、III は *cheA3*、*cheY4* を含み、クラスター外に putative *cheY* が存在する。3つの *cheA* のうち、走化性への関与が証明されているのは *cheA2* のみであり、クラスター II が走化性に関与していると考えられる。しかし、クラスター I や III の遺伝子は、通常の実験条件では発現していない可能性がある。はたしてクラスター I や II は、本当に走化性に関与しないのだろうか。この点について検討するため、応答を調節する CheY の機能に着目した。大腸菌で CheY を過剰発現させると鞭毛の回転方向が逆転するが、コレラ菌でも同様と考えられる。そこでコレラ菌の5種の *cheY* と大腸菌 *cheY* をクローニングし、また大腸菌 CheY で constitutive active とされる D13K に相当する変異体も作製した。それぞれの CheY を過剰発現させたところ、コレラ菌 CheY のうち CheY3 のみが大腸菌やコレラ菌のタンブルを誘発、つまり鞭毛回転を逆転した。それぞれの宿主において、CheY3 の野生型より D16K 変異体が多くタンブルを誘発した。他の CheY もほぼ同程度発現していたが、菌の泳ぎには全く影響しなかった。これらの結果より、鞭毛回転方向制御にはクラスター II に存在する CheY3 のみが関与すると結論した。したがって、クラスター I と III は走化性以外の生理機能の制御に関与する可能性がある。それぞれの生理機能を探るために、現在コレラ菌の各 CheY と相互作用するタンパク質の探索を試みている。

A. Hyakutake, M. Homma, and I. Kawagishi : Functions of 5 CheY homologue of *Vibrio cholerae*: Only CheY3 is involved in chemotaxis.

B510

単べん毛細菌ビブリオ菌の前進と後退で運動特性に違いが生じる原因

○曲山 幸生¹、後藤 知伸²、大谷 敏郎¹、工藤 成史³ (¹ 食総研、² 鳥大・工、³ 桐蔭大・工)

単べん毛細菌の遊泳は、べん毛が菌体を押すモード（前進）と引っ張るモード（後退）からなる。ビブリオ菌 (*Vibrio alginolyticus*) の単極べん毛変異体 (YM4) の遊泳を高輝度暗視野顕微鏡を用いて観察したところ、後退のほうが前進よりも約 1.5 倍速かった (Magariyama et al. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 343-347)。本研究はこの現象の原因を明らかにすることを目標とした。実験面では次のことが判明

した。(1) 前進の遊泳軌跡は直線に近いが、後退は円弧状だった、(2) 前進・後退の運動特性の違いは壁面近くでのみ現れた、(3) 遊泳中のべん毛変形は前進・後退間でごくわずかだった、(4) べん毛の長さや菌体の大きさが2倍程度になってもこの現象に違いが見られなかった。結果2から、モータトルクに前

進・後退間で特性の違いはなく、壁面との力学的な相互作用からこの現象が生じると考えられた。現在私たちは、壁面近くではべん毛が菌体よりも壁面に近い姿勢をとっていると考え、この仮説を検証する実験を計画している。図は遊泳軌跡 (1/30 秒ごとの中心位置を結んだもの) の例である。

Y. Magariyama, T. Goto, T. Ohtani, and S. Kudo : A difference in motion characteristics between forward and backward modes of a single-flagellated bacterium, *Vibrio alginolyticus*

B512

Helicobacter pylori の走化性レセプター変異株の環境応答

石川 直洋^{1,2}、中木原 江利¹、溝手 朝子¹、○相沢 慎一² (¹ 山口県立大、² CREST・JST)

Helicobacter pylori の走化性トランスデューサーとされる tlp(transducer-like protein) A、B、C 遺伝子の機能を明らかにするため、それぞれの変異株を作製し、運動能および各種アミノ酸に対する応答について明らかにした。使用した菌株は *Helicobacter pylori* ATCC43504 である。tlpA、tlpB、tlpC 遺伝子それぞれを pBlueScriptIIKS(+) プラスミドにクローニングし、これに KM カセットを挿入した。自然形質転換により、各々の破壊株を分離した。菌体運動能解析に用いた、微好気条件下で2日間液体培養した。先ず 50mMK-P Buffer(pH7.0) で2回洗浄した後、運動性を記録するために Brucella 培地あるいは最少培地に再懸濁した。走化性応答を調べる為に用いた20種類のアミノ酸溶液は、50mM K-P buffer に溶解し 1mM として用いた。野生株では Brucella 培地で tumbling と smooth を繰り返し、最少培地中では smooth を主として tumbling を時々する泳ぎ方が見られた。tlpA、tlpC 遺伝子破壊株は、Brucella 培地及び最少培地中で運動能において野生株と同様、アミノ酸溶液中では、野生株、tlpA、tlpC 遺伝子破壊が Phe、His、Thr、Pro 溶液中でよく泳いでいた。一方 tlpB 遺伝子破壊株は野生株より遊泳能が低下していたが、His、Pro 溶液中で泳いでいた。また、Brucella 培地中で頻繁に tumbling をしていた。しかし、最少培地に再懸濁することで smooth な泳ぎに変化した。tlpA、tlpB、tlpC それぞれの役割について考察する。

N.Ishikawa, E.Nakakihara, T.Mizote and S.Aizawa : Chemotactic responses of tlp mutants in *Helicobacter pylori*