2P229

好アルカリ性細菌のNa⁺駆動型べん毛モータに対するアルギニンの阻害効果

○渥美 龍男¹、吉村 文信²、杉山 滋^{1,3} (¹名大・院・理・生命、²愛学・菌・微生、³(現住所)食総研・計測工学)

アルカリ性培地 (pH10 前後) で良く生育する好アルカリ性細菌の幾つかの種は、Na⁺ 駆動型べん毛モータを持っている。Na⁺ 駆動型べん毛モータは、細胞膜を介し菌体内外に形成される Na⁺ の電気化学ポテンシャル差による Na⁺ の流入により得られるエネルギーを回転による仕事に変換している。エネルギー共役に関わる Na⁺ の流入について研究を進める為には、特異的阻害剤が有用である。我々はこれまでに、動物上皮細胞の Na⁺ チャネルの阻害剤であるアミロライドが Na⁺ 駆動型べん毛モータのエネルギー変換ユニットの Na⁺ 結合部位に Na⁺ と拮抗的に作用し回転を阻害する事を報告している。アミロライドの阻害は、グアニジル基が主な役割を果たす官能基であることが示唆されている。そこで、他の化合物について探索した結果、グアニジル基を持つアミノ酸、アルギニンが好アルカリ性細菌の Na⁺ 駆動型べん毛モータの機能を阻害することが分かったので報告する。

Na⁺ を 5mM 含む TG 培地 (25mM トリス pH9.5、5mM グルコース) において、好アルカリ性 *Bacillus firmus* RAB 株は 15 μ m/sec の速度で遊泳するが、120mM のアルギニンにより、遊泳速度が 1/10 に阻害される。さらに、希釈してアルギニンの濃度を低下させたり、NaCl を添加して Na⁺ 濃度を上昇させると、速やかに泳ぎが回復した。また、対数増殖している培養液にこの濃度のアルギニンを添加しても、少なくとも 30 分は全く影響なく増殖を続ける。したがって、アルギニンは菌体の生理機能、エネルギー状態に著しい影響を与える事無く、直接的かつ可逆的、Na⁺ と拮抗的に作用して、Na⁺ 駆動型べん毛モータの回転を阻害していると考えられる。この結果は、一水和した Na⁺ と同じ大きさのグアニジル基がモータの Na⁺ 結合サイトに結合し、Na⁺ の流入を阻害するという考え方を支持するものである。現在、より詳細な速度論的解析を進めている。

T.Atsumi, F.Yoshimura, S.Sugiyama : Effect of arginine for Na⁺-driven flagellar motor of alkalophilic *Bacillus*.

2P231

無細胞タンパク発現系を用いた機械受容チャネル MscL の合成

○吉村 建二郎^{1,2}、野村 健²、曾我部 正博^{2,3,4} (¹筑波大院・生命環境・構造生物、²科技振・細胞力覚、³名大院医・細胞生物物理、⁴生理研・分子生理)

バクテリアが低浸透圧ショックを受けた時、機械受容チャネル MscL が開き低分子の物質を細胞内から投棄することにより、細胞の破裂を防ぐ。MscL は細胞膜の張力を直接感じて開く機械受容チャネルである。開いた状態のコンダクタンスは約 2.5 pS と大きく、直径が約 30 から 40 Å の穴が開くと見積もられている。その時、サブユニット間、あるいはサブユニット内で大きな構造変化が起こらないと、このような大きな穴は開かない。5つのサブユニットがカメラの絞りのような動きをすることによりイオンが通る穴が開くというモデルが提唱されている。閉じた状態の MscL の結晶構造は分かっているが、開くときにどのような構造変化を起こしているかを知るためには、開いた状態の構造を知ることが必要である。しかし、MscL が開くと細胞内の低分子が失われるため、開きっぱなしになると細胞は死んでしまい、開いた状態の MscL を大量に細胞に発現させることは不可能である。細胞での発現に代わる方法として、無細胞タンパク発現系で合成する方法を開発した。細胞膜が存在しない条件で合成しても 5 量体を形成することが分かった。人工膜に取り込んでバッチクランプしたところ、膜の張力に応じて開く機能が正常に保たれていることが確認できた。さらに、点突然変異を入れるとチャネルが拡大した構造を持つことを生化学的に明らかにした。

K. Yoshimura, T. Nomura, and M. Sokabe : Expression of mechanosensitive channel MscL with cell-free system

2P230

新しい急速液交換法をもちいた、マウス心室筋 Na/Ca 交換電流の活動電位波形への寄与の検討

○塩谷 孝夫 (佐賀大・医・生体構造機能)

心筋の興奮性の生理や病態生理の研究にマウス心筋細胞が多用されるようになった。しかし、報告されたマウス心筋の活動電位波形には、プラトー相の有無・活動電位持続時間などに極めて大きなばらつきがある。そこで、マウス単離心筋細胞から生理的条件下で活動電位を記録し、この活動電位波形のばらつきが発生する機序をしらべた。ホールセル法で記録した活動電位には -30 mV 付近にピークをもつプラトー相が認められ、活動電位持続時間 (APD) は 160 ± 9.0 ms であった。同様な活動電位波形がニスタチン穿孔パッチ法で細胞内環境を維持した条件でも記録されたことから、生理的な活動電位にはプラトー相が存在すると考えられた。いっぽう、細胞内に BAPTA (2 mM) を負荷した状態ではプラトー相が完全に消失して活動電位は短縮し (APD = 36.3 ± 3.1 ms)、活動電位波形のばらつきが再現された。同様な活動電位の短縮がリアノジン (20 μ M) の細胞内投与でも認められ、これから [Ca²⁺]_i トランジェントがプラトー相の形成に関与していると考えられた。さらに、KB-R7943 (5 μ M) の細胞外投与がプラトー相を消失させたことから、内向き Na/Ca 交換電流が [Ca²⁺]_i トランジェントにより誘発され、それがプラトー相を形成している可能性が考えられた。この可能性を検証するため、新規に開発した急速液交換装置をもちいて、活動電位を記録しながら細胞外 Na⁺ を Li⁺ に急速交換する実験を行った。Li⁺ 外液中ではプラトー相が消失し、プラトー相の形成に対する Na/Ca 交換電流の寄与が強く支持された。以上の実験結果から次に結論した。1) マウス心室筋細胞の活動電位には、内向き Na/Ca 交換電流によって形成されるプラトー相が存在する、2) したがって活動電位波形は [Ca²⁺]_i トランジェントにより大きく影響され、それが波形のばらつきとして観察される。

Takao Shioya : Contribution of Na/Ca exchange current to the action potential waveform in mouse ventricular myocytes

2P232

B. subtilis の多剤排出蛋白質 EbrAB: EbrB 単独での機能発現について

○菊川 峰志¹、奈良 敏文²、宮内 正二²、加茂 直樹²、荒磯 恒久¹ (¹北大・先端研・生体分子機能、²北大院・薬・生物物理化学)

EbrAB は *B. subtilis* に存在する多剤排出系であり、EbrA と B はどちらも、細菌類に広く分布する最も小型の多剤排出蛋白質: small multidrug resistance (smr) ファミリーと一次構造上に高い similarity を有している。近年、行われた大腸菌の smr 蛋白質である EmrE の電子線及び X 線結晶構造解析の結果は、多くの smr 蛋白質は同一のポリペプチドによるが構造的には hetero な dimer として機能していることを示唆するものであった。これに対して、EbrAB の場合には、EbrA と B の二つのポリペプチドが同時に発現されなければ、菌体が多剤耐性を発揮し得ないことが明らかにされている。したがって、EbrA と B には、複合体の機能にとって重要なアミノ酸残基もしくは構造を相互に補完しあうような機構が存在しているはずである。

我々は、EbrA と B の間で、ループ部位と C 末領域の親水性が異なり、かつ、それらが他の smr homologue とも異なることに着目し、これらの部位の複合体形成における役割について検討した。EbrA 及び B を大腸菌にて発現させ、菌体からの ethidium bromide の排出活性を測定したところ、EbrB はその親水的な C 末領域を欠失させることで、単独でも EbrAB 複合体と同程度の排出活性を持ち得ることを見出した。この結果は、EbrA と B の間で相互に補完されているのは、アミノ酸残基ではなく構造であること、また、それぞれが取り得る構造の選択性は親水性に富むループ部位や C 末領域が担っていることを示唆している。本年会ではさらに、C 末を欠失させた EbrB と EbrAB 複合体の種々の薬物排出活性の比較、及び EbrA と B の膜貫通トポロジーについて議論したい。

T.Kikukawa, T.Nara, S.Miyauchi, N.Kamo and T.Araisio : *B. subtilis* multidrug transporter EbrAB: Single polypeptide, EbrB, functions with C-terminus truncation