2P205

Vibrio alginolyticus のもつ二種類のべん毛モーターは単一の CheY により異なる様式で制御される

○小嶋 勝¹、久保 瑠美²、本間 道夫¹、川岸 郁朗^{1,3} (¹ 名大・院理・生命理学、² 名大・理・生命理学、³ 名大・高等研究院)

海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* は二種類のべん毛をもつ。すなわち、溶液中を泳ぐのに適した極べん毛と個体表面をはうのに適した側べん毛である。我々はすでに、どちらの運動も走化性制御を受けることを示した。*V. alginolyticus* の走化性情報伝達は大腸菌と同様に、応答調節因子 CheY がリン酸化され、べん毛のスイッチ複合体に結合することで回転方向を変化させると考えられる。二種類あるべん毛の制御はどのように行われているのだろうか。我々はこれまでに、*V. alginolyticus* の *cheY* 遺伝子のクローニング、*cheY* 欠失株の構築を行った。欠失株は極べん毛、側べん毛共に走化性応答を示さず、これは単一の CheY によって相補されたことから、2つのべん毛は共通の CheY の制御を受けていることが示された（昨年度の年会で報告）。今回、テザードセル法を用いて回転方向を詳しく解析したところ、興味深いことに、極べん毛は大腸菌と同じ回転方向制御型だが、側べん毛は stop-and-go 型である可能性が示唆された。近縁種のゲノム配列から CheY の標的である FliM の配列を調べたところ、極べん毛の FliM には、大腸菌で示されている CheY 結合配列が保存されていたが、側べん毛の FliM はこの配列をもたなかった。すなわち、回転制御様式の違いはスイッチ側の違いによって決定されていると考えられる。一方、新たにいくつかの変異 CheY を作製したところ、変異部位によっては極べん毛と側べん毛による運動に与える影響が異なっていた。これは、単一の CheY が異なる様式でモーター制御を行うことを示唆するものである。すなわち、CheY と側べん毛の FliM、極べん毛の FliM との結合様式が異なると考えられ、現在この点を検討中である。

M.Kojima, R.Kubo, M.Homma and I.Kawagishi : A single CheY regulates two different flagellar motors in different ways in *Vibrio alginolyticus*.

2P207

サルモネラ菌低速回転べん毛モーターの機能解析

○真下 拓史¹、相沢 慎一^{1,2}、山口 滋¹ (¹ JST CREST、² 県立広島大学)

べん毛モーターの回転方向の切り替えスイッチは Fli G、Fli M、Fli N の 3 種類の構成タンパク質からなる。これらのタンパク質に小さな変異（多くはアミノ酸 1 個）が起こると、切り替えスイッチが利かなくなる（Che-）ものや運動性の無い（Mot-）mutant が出てくる。このたび私達は Mot- mutant として分類されているものの中に液体培地中では動いているものを発見した。これらの mutant の遊泳速度は野生株の 1/5 程である。半流動培地のような粘性の高い環境下ではトルクが小さいためにべん毛同士がもつれて動けなくなると考えられる。さらにこれらの mutant の中には低温でより高い運動性を示す（温度感受性）ものがあることがわかった。そこで、これらの mutant のべん毛モーターの機能解析のため、テザードセル法で回転速度を計測し、温度と速度分布の相関を調べた。

T.mashimo S.sizawa S.yamaguchi : Functional analysis of the slow-running flagellar motor in Salmonella

2P206

大腸菌べん毛モーター P リングタンパク質 FlgI : 分子内ジスルフィド結合とリング形成の解析

○檜作 洋平¹、薬師 寿治¹、川岸 郁朗^{1,2}、本間 道夫¹ (¹ 名大・院理・生命、² 名大・高等研究院)

大腸菌べん毛モーターの基部体は、MS、P、L リングとそれらを貫くロッドから構成される。これらのリングの 1 つ、P リングは、前駆体として合成された FlgI がペリプラズム領域に分泌され、ロッドの周りに 26 分子が集合することで形成されると考えられている。P リングの形成過程において、Dailey と Berg (1993) は、FlgI が持つ 2 つの Cys 残基が形成する分子内ジスルフィド結合が P リング形成に必須であると提唱した。本研究では、FlgI の分子内ジスルフィド結合がどのような役割を果たすのかを解析した。FlgI の 2 つの Cys 残基をそれぞれ Ala に置換した Cys 置換 FlgI は *flgI* 欠失変異株の運動能を回復させた。各変異体をウェスタンブロッティングで解析したところ、野生型 FlgI 発現株に比べ大幅にタンパク質量が減少していた。これらの結果から、FlgI の分子内ジスルフィド結合は、P リングアセンブリに必須なものではなく、形成されることによって FlgI が分解されにくくなるという仮説が考えられた。

今回、変異 FlgI 発現株が P リングを保持していることを電子顕微鏡で観察した。またべん毛欠損株において変異 FlgI を一過的に発現誘導し、誘導停止後一定時間培養したところ、野生型 FlgI がほとんど残存していたのに対し変異 FlgI はほぼ完全に枯渇していた。これらの結果は先の仮説を支持するものである。また *flgI* 欠失変異株において同様の実験を行ったところ、一定時間経過後も変異 FlgI は一部が残存していた。この時、運動能は保持されていた。この結果はべん毛形成に依存して変異 FlgI の一部が分解されにくい状態になっていることを示し、それは P リングを形成した状態であることが推測される。つまり、FlgI がモノマーの時はジスルフィド結合が形成できないと分解されやすくなるが、一度 P リングを形成するとジスルフィド結合がなくても分解されにくくなると考えられる。

Y.Hizukuri, T.Yakushi, I.Kawagishi and M.Homma : The flagellar P-ring component protein FlgI of *Escherichia coli*: Analysis of its intramolecular disulfide bond and ring assembly

2P208

ビブリオ菌極毛モーターの回転数トルク特性

○西島羽 恵美¹、曲山 幸生²、杉山 滋²、工藤 成史¹ (¹ 桐蔭横浜大・工、² 食総研)

べん毛モーターは、H⁺ または Na⁺ が菌体外から流れ込む際に得られるエネルギーを、べん毛回転に変換している。ビブリオ菌のモーターは Na⁺ 駆動型モーターである。モーターの動作原理を機能的側面から調べる際の重要な特性として、回転数-トルク特性がある。Sowa ら (J. Mol. Biol. 327, 1043-1051 (2003)) は、マイクロビーズをビブリオ菌のべん毛に付着させる方法を用いてモーターのトルク特性を調べ、低回転数側ではトルクは一定で、高回転数側では減少すると報告している。今回我々は、高分子で溶液の粘度を変化させたときの、遊泳中のビブリオ菌のべん毛回転数と遊泳速度を測定し、回転数-トルク特性を見積もった。菌は *Vibrio alginolyticus* の YM42 株（べん毛を一本のみ持ち、前進のみの菌）を使用した。べん毛回転数と遊泳速度の計測にはレーザー暗視野顕微鏡を用いた。水溶液に添加する高分子としては Ficoll を使い、0.9 mPa s から 10 mPa s の粘度の範囲で測定した。溶液の粘度は、振動式粘度計で測定した。Ficoll 水溶液では、マクロな粘度とミクロな粘度の差がほとんどないと言われている (Berg H.C. & Turner L., Nature 278, 349-351 (1979))。モーターの発生トルクは、べん毛に加わっている粘性トルクを、べん毛回転数と遊泳速度の測定値から流体力学のストークス近似に基づく理論式を使って計算した。Na⁺ 濃度が 300 mM のとき、トルクは低回転数側で一定でいったん急激に減少した後、回転数が上がると徐々に落ちていくという、Sowa らとは異なる結果が得られた。さらに、Na⁺ 濃度 20 mM では、Sowa らと同様の結果が得られた。今後、Na⁺ 濃度を変えて同様の測定を行う予定である。

M. Nishitoba, Y. Magariyama, S. Sugiyama and S. Kudo : Rotation rate-torque characteristics of polar flagella of *Vibrio alginolyticus*